

**PROCEDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE  
DETERMINEE PAR DES SOUCHES MONOCARYOTIQUES DE *P.  
CINNABARINUS***

---

La présente invention concerne l'utilisation de souches monocaryotiques de champignons filamenteux de l'espèce *Pycnoporus* du groupe basidiomycète, pour la mise en oeuvre d'un procédé de préparation d'une protéine recombinante déterminée, ledit procédé étant effectué par surexpression du gène codant pour cette protéine dans la souche monocaryotique susmentionnée de *Pycnoporus*.

A l'heure actuelle, deux modèles fongiques sont utilisés préférentiellement par les grands groupes industriels dans le cadre de la production d'enzymes intervenant dans les biotransformations végétales, telles que les métalloenzymes. Il s'agit d'*Aspergillus*, et de *Trichoderma*, qui appartiennent au groupe des deutéromycètes. Toutefois, les rendements de production à l'aide de ces modèles, notamment en production de laccases, n'excèdent pas les 150 mg/l.

La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs du fait que la transformation de souches monocaryotiques de *P. cinnabarinus* déficientes pour l'activité laccase à l'aide de vecteurs contenant le gène codant pour cette laccase et dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur identique au promoteur *pLac* endogène de la laccase de *P. cinnabarinus*, conduit à une production équivalente de laccase que lors de la mise en oeuvre d'un procédé de surproduction de laccase par induction du promoteur endogène de cette laccase par action de l'éthanol sur des souches monocaryotiques de *P. cinnabarinus* non déficientes pour l'activité laccase, et qui égale le g/l.

Des résultats similaires ont été obtenus par les Inventeurs en utilisant le promoteur *gpd*, et le promoteur *sc3* de *Schizophyllum commune*, en lieu et place du promoteur *pLac* susmentionné.

La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'une protéine recombinante déterminée, ledit procédé étant effectué par surexpression du gène codant pour cette protéine déterminée dans une souche monocaryotique de champignons filamenteux de l'espèce *Pycnoporus* du groupe basidiomycète, et comprend :

- une étape de mise en culture de la souche monocaryotique de *Pycnoporus* susmentionnée, ladite souche étant transformée à l'aide d'un vecteur d'expression

contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée, dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant à un promoteur endogène des champignons susmentionnés, ou d'un promoteur différent (encore désigné promoteur exogène), ledit promoteur étant constitutif ou inductible,

- le cas échéant une étape d'induction du promoteur susmentionné, lorsque celui-ci est inductible,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la protéine recombinante déterminée, produite dans le milieu de culture.

L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée pour la surexpression du gène codant pour la protéine recombinante déterminée, est telle qu'obtenue par mise en culture de la souche dicaryotique d'origine à 30°C dans le noir pendant 15 jours, suivie d'une étape d'exposition au jour 2 à 3 semaines à température ambiante jusqu'à la formation d'organes de fructification correspondant à des hyphes différenciées appelées basides, au sein desquels a alors lieu la caryogamie (fusion des noyaux), suivie de la méiose qui conduit à la formation de quatre spores sexuées, ou basidiospores haploïdes génétiquement différentes, qui, après germination, engendrent un mycélium monocaryotique.

Avantageusement, la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée dans le procédé susmentionné de l'invention, est une souche de *Pycnoporus cinnabarinus*.

Les protéines recombinantes déterminées surexprimées dans le cadre de la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, correspondent soit à des protéines endogènes de *Pycnoporus*, soit à des protéines exogènes différentes des protéines endogènes de la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production desdites protéines. Notamment ces protéines exogènes correspondent à des protéines endogènes de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telles que les enzymes basidiomycètes intervenant dans les biotransformations végétales, ou correspondent à des protéines endogènes de souches de *Pycnoporus* différentes de la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production desdites protéines.

L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce que les protéines recombinantes déterminées correspondent :

- aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :

- \* les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,

\* ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la  $\beta$ -glycosidase, l'invertase, ou l' $\alpha$ -amylase,

- aux protéines exogènes choisies parmi les suivantes :

\* les tyrosinases de souches de *Pycnoporus* différentes de la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production desdites protéines, telle que la tyrosinase de *Pycnoporus sanguineus* lorsque la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production de cette tyrosinase est différente de *Pycnoporus sanguineus*,

\* les laccases de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telle que la laccase d'*halocyphina villosa* (basidiomycète halophile),

\* les cinnamoyl estérases A (numéro EMBL Y09330) et B (numéro EMBL ANI309807) d'*Aspergillus niger*.

Avantageusement, notamment dans le cas de la préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée, afin de ne pas avoir à séparer la protéine recombinante déterminée de la protéine endogène à laquelle elle correspond lors de la purification de ladite protéine recombinante.

En variante, notamment dans le cas de la préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée peut ne pas être déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée, ladite souche étant alors transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée marquée afin de la distinguer de la protéine endogène lors de l'étape de purification. A titre d'illustration, la protéine recombinante déterminée peut être marquée par une étiquette histidine (His-tag).

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant au promoteur endogène de cette laccase,

- une étape d'induction du promoteur susmentionné, notamment par addition d'éthanol, ou de sous-produits agricoles contenant de la lignocellulose comme la paille de blé, les sons de maïs et la pulpe de betterave, ou des composés à cycle aromatique comme la 2,5-xylidine, l'acide vératrylique, le guaïcol, l'alcool vératrylique, la syringaldazine, l'acide férulique, l'acide caféique et les lignosulfonates,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., Herpoel I., Frasse P., Moukha S., Lesage-Meessen L., Asther M. 1999 ; Laccase production by a monokaryotic strain *Pycnoporus cinnabarinus* derived from a dikaryotic strain ; World Journal of Microbiology and Biotechnology 15, 481-484.

L'invention concerne plus particulièrement un procédé tel que défini ci-dessus, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique (ou acide nucléique) SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, notamment par une étiquette His-tag, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase susmentionnée, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., et al. (1999) susmentionné.

L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase

de *Pycnoporus* dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur exogène choisi parmi :

- \* le promoteur *gpd* de l'expression du gène codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 4,

- \* ou le promoteur *sc3* de l'expression du gène codant pour l'hydrophobine de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 5,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., et al. (1999) susmentionné.

L'invention concerne plus particulièrement un procédé tel que défini ci-dessus, de préparation de la laccase correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, notamment par une étiquette His-tag, dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur exogène *gpd* ou *sc3*,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., et al. (1999) susmentionné.

L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé tel que défini ci-dessus, de préparation de tyrosinase recombinante correspondant à la tyrosinase de *Pycnoporus sanguineus* représentée par SEQ ID NO : 16, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus* transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 15 codant pour la tyrosinase recombinante représentée par SEQ ID NO : 16, le cas échéant marquée, la séquence SEQ ID NO : 15 étant avantageusement précédée par la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 128 et 190 de SEQ ID NO : 1 codant pour le peptide signal de *Pycnoporus cinnabarinus* délimité par les 21 premiers aminoacides de SEQ ID NO : 2,

et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la tyrosinase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 16 produite dans le milieu de culture.

L'invention concerne plus particulièrement un procédé tel que défini ci-dessus, de préparation de laccase recombinante correspondant à la laccase d'*halocyphina villosa* représentée sur la figure 12 (SEQ ID NO : 18), caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique représentée sur la figure 12 (SEQ ID NO : 17) codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 18, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 18 produite dans le milieu de culture.

L'invention a également pour objet la séquence nucléotidique codant pour le promoteur *pLac* de la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, et correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3, ou toute séquence dérivée de ce promoteur par substitution, addition ou suppression d'un ou plusieurs nucléotides et conservant la propriété d'être un promoteur de l'expression de séquences.

L'invention concerne également tout vecteur d'expression, tel que le plasmide pELP, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO : 3 du promoteur *pLac* susmentionné, ou une séquence dérivée telle que définie ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout vecteur d'expression tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour une protéine recombinante déterminée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* susmentionné, ou d'une séquence dérivée telle que définie ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement tout vecteur d'expression tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que la protéine recombinante déterminée est une protéine correspondant :

- aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :
  - \* les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,
  - \* ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la  $\beta$ -glycosidase, l'invertase, ou l' $\alpha$ -amylase,
- aux protéines exogènes choisies parmi les suivantes :
  - \* les tyrosinases de souches de *Pycnoporus* différentes de la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production desdites protéines, telle que la tyrosinase de *Pycnoporus sanguineus* lorsque la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production de cette tyrosinase est différente de *Pycnoporus sanguineus*,
  - \* les laccases de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telle que la laccase d'*halocyphina villosa* (basidiomycète halophile),
  - \* les cinnamoyl estérases A et B d'*Aspergillus niger*.

L'invention concerne également toute cellule hôte transformée à l'aide d'un vecteur d'expression tel que défini ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute cellule hôte susmentionnée, correspondant à des cellules monocaryotiques de souches de *Pycnoporus*, telles que les souches de *Pycnoporus cinnabarinus*.

L'invention a également pour objet l'utilisation de vecteurs d'expression tels que définis ci-dessus, ou de cellules hôtes susmentionnées, pour la mise en oeuvre d'un procédé de surproduction d'une protéine recombinante déterminée telle que définie ci-dessus.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit du SEPC : Système d'Expression *Pycnoporus cinnabarinus*, à savoir du développement d'un modèle d'expression fongique performant permettant de s'affranchir des modèles industriels utilisés actuellement par les grands groupes européens (*Aspergillus* et *Trichoderma*).

En résumé, il s'agit d'un système d'expression eucaryote et plus spécifiquement de champignon filamenteux du groupe basidiomycète, *Pycnoporus cinnabarinus*, qui a été développé par les Inventeurs pour la surexpression de protéines d'intérêt industriel. Ce travail a été fait dans le cadre de l'étude de métalloenzymes, telles que les laccases, et en particulier a permis de cloner les gènes impliqués pour leur surexpression, et de

surproduction des laccases en grande quantité à l'aide de fermenteurs, ceci afin de les utiliser dans des applications industrielles à usage alimentaire (panification, préparation de boissons afin de moduler la couleur du thé, aider à la clarification des jus de fruits et des boissons alcoolisées, formation d'agropolymères) et non alimentaire (traitement des « jeans », dégradation de polluants aromatiques dans les sols, bioblanchiment des fibres lignocellulosiques dans le domaine des pâtes à papier).

### **I) Obtention de lignées monocaryotiques de *Pycnoporus cinnabarinus* pour la transformation du champignon et la surproduction de gènes d'intérêt.**

Cette étape a pour but d'isoler puis de sélectionner des lignées cellulaires haploïdes issues des spores sexuées d'un champignon filamenteux, *Pycnoporus cinnabarinus*, qui seront utilisées en temps qu'hôte pour l'expression des gènes d'intérêt. *P. cinnabarinus* est un champignon hétérothallique qui se trouve à l'état sauvage sous forme dicaryotique (deux noyaux non appariés par cellule) à partir duquel des lignées monocaryotiques sont sélectionnées (un noyau par cellule), potentiellement plus stable et donc utilisable pour la transformation génétique. Dans le cadre de cette étude les Inventeurs se sont attachés à sélectionner de lignées monocaryotiques déficientes pour l'activité laccase (lac<sup>-</sup>). A l'état dicaryotique, le champignon peut se multiplier par voie végétative (Fig. 1). Mais, sous l'influence de conditions environnementales particulières, on peut induire, en laboratoire, la formation d'organes de fructification. Au sein d'hyphes différenciées appelées basides, a alors lieu la caryogamie (fusion des noyaux), suivie de la méiose qui conduit à la formation de quatre spores sexuées, ou basidiospores haploïdes génétiquement différentes. Après germination, chaque basidiospore engendre un mycélium monocaryotique. Un simple test colorimétrique permet ensuite de ne sélectionner que les souches dépourvues d'activité laccase.

#### *1) Isolement des souches monocaryotiques*

Le milieu de fructification est composé d'extrait de malt 2% (P/V) et de l'agar (1,6% P/V). Les cultures sontensemencées dans des boîtes de Pétri et gardées à 30°C dans le noir pendant 15 jours avant de les exposer au jour 2 à 3 semaines à température ambiante. Le corps de fructification apparaît orange-rouge. Les monospores sont alors récoltées avec de l'eau stérile sur le couvercle de la boîte de Pétri. La suspension est

diluée et mise en culture dans des boîtes de Pétri contenant un milieu MA2 (malt 2% P/V et agar 2% P/V) dans le but d'isoler des colonies. Des cultures pures isolées sont piquées et gardées dans du milieu MA2 à 30°C pendant 5 jours et stockées à 4°C.

Dans ces conditions, une souche monocaryotique déficiente pour l'activité laccase a été sélectionnée pour la transformation avec le vecteur d'expression dans le but de surexprimer le gène de la laccase. Une étude en Southern blot a été effectuée et a permis de démontrer que cette souche est déficiente pour le gène codant pour la laccase chez *P. cinnabarinus*.

### 2) Test rapide de détection de l'activité laccase des colonies monospores

Un morceau de mycélium est déposé dans une boîte de Petri et recouvert d'une goutte de syringaldazine 0,1% (P/V) en solution éthanolique ; Après 15 minutes, un changement de couleur est observé. Le 2,2-azino-bis-[3-ethylthiazoline-6-sulfonate] (ABTS) peut-être utilisé également comme substrat pour révéler une activité laccase.

### 3) Conditions de cultures pour produire la laccase

Un inoculum est prélevé des précultures qui ont poussé 10 jours à 30°C dans des fioles de Roux contenant 200 mL d'un milieu synthétique avec la composition suivante pour 1L : maltose (20 g), tartrate de diammonium (1,84 g), tartrate de disodium (2,3 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,33 g),  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,07 g),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,046 g),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,035 g),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,1 g), extrait de levure (1 g), solution de vitamines (1 mL/L) selon Tatum et al. (Biochemical mutant strains of *Neurospora* produced by physical and chemical treatment. American Journal of Botany, 37 : 38-46, 1950). Le mycélium de deux fioles est collecté, mélangé à 100 mL d'eau stérile et broyés au mixeur Ultraturax 60 sec. Pour produire de la laccase, le milieu synthétique est inoculé par 1 mL de la suspension de mycélium. Le milieu (100 mL) est ensuite incubé à 30°C dans des fioles erlenmeyer bafflées de 250 mL sous agitation (120 rpm).°

## II) Clonage du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* et de son promoteur en vue de la construction d'un vecteur d'expression

Il s'agit d'un système d'expression eucaryote et plus particulièrement de champignon filamenteux, *Pycnoporus cinnabarinus*, du groupe basidiomycète pour la

surproduction de protéines recombinantes déterminées. Le modèle d'étude sélectionné est celui de la laccase de *P. cinnabarinus*. A l'heure actuelle, deux modèles fongiques sont utilisés préférentiellement par les grands groupes industriels. Il s'agit d'*Aspergillus* et de *Trichoderma* qui appartiennent au groupe des Deutéromycètes. Ce système d'expression est donc tout à fait original et devrait combler la lacune concernant le développement de système d'expression basidiomycète compatible avec les exigences des industriels (possibilité de production à grande échelle de protéines sécrétées dans le milieu extra-cellulaire et culture du champignon producteur en fermenteur).

1) *Clonage de gène de la laccase de Pycnoporus cinnabarinus et de son promoteur*

Dans une première étape, les Inventeurs ont amplifié un fragment du gène codant pour la laccase à l'aide d'amorces nucléotidiques dégénérées (Fig. 2). Les amorces dégénérées amont F2 (SEQ ID NO : 6 ; CAYTGGCAYGGRTTCTTCC) et aval R8 (SEQ ID NO : 7 ; GAGRTGGAAGTCRATGTGRC) ont été déduites, respectivement, des régions de liaison au cuivre I et IV des laccases d'organismes voisins et utilisées dans une réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant l'ADN génomique de *P. cinnabarinus* I-937. A 10 µl de mélange réactionnel sont ajoutés : 100 ng d'ADN génomique; 0.2 mM de dATP, dCTP, dTTP, and dGTP; 25 pmol de chaque amorce nucléotidique; 0.1 volume de tampon 10X *Pfu* polymerase (100 mM Tris-HCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, pH 8,3) and 1 U de polymerase *Pfu*. Le mélange est chauffé à 94°C pendant 5 min avant d'ajouter la polymérase. Les conditions de la réaction sont les suivantes : 5 cycles de 94 °C, 5 min; 55 °C, 30 s; et 72 °C, 4 min; puis 25 cycles of 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s, et 72 °C, 3 min. Une étape de 10 min à 72°C est effectuée afin de finir la réaction. Une bande de 1,64 kpb a été obtenue correspondant à la partie centrale du gène de la laccase. La séquence ADN a été clonée dans pGEM-T afin de séquencer cette partie du gène.

Par une technique de Southern blot (Fig. 3), nous avons défini les sites de restriction appropriés afin d'obtenir un fragment d'ADN minimum, pouvant contenir l'intégralité de gène de la laccase, et qui sont susceptibles de servir à amplifier les extrémités 5' et 3' manquantes. Un Southern blot a été effectué avec l'ADN génomique de *P. cinnabarinus* avec les enzymes, *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Sma*I and *Xba* I et a permis de sélectionner *Pst*I qui donne une bande de 3.5 kpb par digestion de l'ADN génomique. Afin d'amplifier les parties manquantes du gène, une technique de PCR

inverse a été utilisée avec un mélange de PCR contenant des amorces nucléotidiques spécifiques de la partie centrale précédemment isolée et de l'ADN génomique de *P. cinnabarinus*. La réaction de PCR est effectuée avec 150 ng d'ADN coupé par *Pst*I et recircularisé sur lui-même par ligation et les amorces nucléotidiques Fex (SEQ ID NO : 8 ; GGATAACTACTGGATCCGCG) et Rex (SEQ ID NO : 9 ; CGCAGTATTGCGTGGAGAG). Les conditions de la réaction sont les suivantes : 5 cycles de 94 °C, 5 min; 55 °C, 30 s; et 72 °C, 5 min; puis 25 cycles of 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s, et 72 °C, 4 min avec une étape finale de 10 min à 72 °C. Le fragment d'ADN amplifié correspond à une bande de 2,7 kpb qui a été cloné dans pGEM-T et séquencé.

L'intégralité du gène codant pour la laccase a été ensuite définie en combinant la partie centrale et les parties 5' et 3' amplifiées. Afin de vérifier cette séquence, l'intégralité du gène a été amplifié (3,331 kpb, Fig. 4) avec les amorces nucléotidiques Fin (SEQ ID NO : 10 ; GACATCTGGAGCGCCTGTC) et Rin (SEQ ID NO : 11 ; ATCGAAGGTTCCGATGACTGACATGAC) à partir de l'ADN génomique de *P. cinnabarinus*. Ce gène a été également cloné à partir de l'ADN génomique de *P. cinnabarinus* ss3 et s'est avéré être identique à celui isolé chez *P. cinnabarinus* I-937.

## 2) Construction du vecteur d'expression utilisant le promoteur du gène de la laccase

A partir de la séquence du gène de la laccase, les Inventeurs ont cloné le promoteur de ce gène en utilisant la même stratégie employée précédemment pour l'isolement du gène, c'est-à-dire avec une technique de PCR inverse sur un fragment d'ADN génomique (3,5 kpb) coupé cette fois-ci par l'enzyme de restriction *Bgl*III (Fig. 5). Deux mille cinq cent vingt sept kpb en avant du gène de la laccase ont été ainsi cloné par PCR inverse et séquencé. Ce promoteur a été placé dans un vecteur une résistance à l'ampicilline pour son sous-clonage dans la bactérie et une résistance à la phléomycine utilisé comme marqueur de sélection dans le champignon. Un terminateur du gène codant pour l'hydrophobine sc3 de *Schizophyllum commune* a été placé en aval afin de terminer l'étape de transcription. Ce vecteur appelé pELP sera utilisé pour l'expression homologue de la laccase (Fig. 6). Deux autres promoteurs hétérologues ont été utilisés dans cette étude. Ce sont les promoteurs des gènes codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (gpd) et l'hydrophobine (sc3) de *Schizophyllum commune*

(Fig. 6), constituant respectivement les vecteurs d'expression pEGT et pESC. L'intégralité des séquences nucléotidiques de vecteurs pEGT (SEQ ID NO : 12), pESC (SEQ ID NO : 13), et pELP (SEQ ID NO : 14), se trouvent dans les figures 7, 8 et 9 avec les positions du promoteur, du marqueur de sélection et du terminateur.

### III) Transformation de la souche monocaryotique avec les vecteurs d'expression (modèle d'étude : la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*)

#### 1) Préparation du mycélium pour l'obtention de protoplastes

Un quart d'une colonie cultivée en milieu solide (10 jours) est homogénéisé avec un mixeur (type Ultraturax, vitesse lente) pendant une minute dans 50 ml de milieu YM (par litre : glucose 10 g, peptone 5 g, extrait de levure 3 g, extrait de malt 3 g). Le broyat est transféré dans un erlenmeyer de 250 ml stérile où l'on rajoute 50 ml de milieu YM, puis incubé à 30°C et sous agitation (225 rpm) pendant 20 heures. La culture est une nouvelle fois homogénéisée pendant 1 min (vitesse lente) et on rajoute 100 ml de milieu YM. Le broyat est transféré dans un erlenmeyer de 500 ml et mis en culture pendant une nuit à 30°C.

#### 2) Préparation des protoplastes

La culture de champignon est centrifugée pendant 10 min à 2000 rpm dans un rotor oscillant (tube de 50 ml). Seize g (poids humide) sont lavés dans 40 ml d'une solution de  $MgSO_4$  0,5 M ou de saccharose 0,5 M. Dans le cas de l'utilisation du saccharose, l'enzyme lytique utilisée pour digérer les parois est diluée dans le saccharose. Le mycélium est ensuite centrifugé 10 min à 2000 rpm et le surnageant éliminé. Concernant la lyse des parois fongiques, on ajoute au mycélium provenant de 50 ml de culture, 10 ml d'enzyme lytique (Glucanex, Sigma) dilué à 1 mg/ml dans une solution de  $MgSO_4$  0,5 M. La digestion se fait dans un erlenmeyer de 500 ml à 30°C sous faible agitation pendant 3 à 4 heures. Pendant cette incubation, l'apparition des protoplastes est contrôlée au microscope. Dix ml d'eau stérile sont rajoutés, puis mélangés délicatement. Les protoplastes sont laissés 10 min, le temps que l'équilibre avec l'eau se fasse (les protoplastes vont flotter à la surface). Ils sont ensuite centrifugés 10 min à 2000 rpm dans un rotor oscillant. Le surnageant contenant les protoplastes est transféré délicatement dans un nouveau de 50 ml. Le culot restant peut-être re-incubé avec 25 ml d'une solution de  $MgSO_4$  0,5M pour récupérer le maximum de protoplastes

(on répète alors l'étape de centrifugation). Un volume de sorbitol 1 M, égal à celui de la préparation des protoplastes, lui est rajouté. Pendant 10 min, on laisse les protoplastes relarguer l'eau. Cette préparation est ensuite centrifugée 10 min à 2000 rpm. Le surnageant est éliminé, tout en laissant un peu de sorbitol. Les protoplastes sont transférés dans un nouveau tube. Le précédent tube est rincé avec la solution de sorbitol 1M et les protoplastes récupérés, ajoutés dans le nouveau tube. Les protoplastes sont comptés et centrifugés 10 min à 2000 rpm. Ils sont ensuite dilués à une concentration de  $2 \cdot 10^7$  protoplastes par ml dans la solution de sorbitol 1M. Une solution de  $\text{CaCl}_2$  à 0,5 M (1/10) est rajoutée aux protoplastes.

### ***3) Transformation des protoplastes***

Pour la transformation, 100  $\mu\text{l}$  de protoplastes sont transformés avec 5 à 10  $\mu\text{g}$  de vecteur (volume maximum de 10  $\mu\text{l}$ ) dans un tube stérile de 10 ml. Ils sont alors incubés 10 à 15 min dans la glace. Un volume d'une solution de PEG 4000 à 40% est ajouté, puis mélangé et les protoplastes sont incubés 5 min à température ambiante. Deux et demi ml de milieu de régénération (pour 100 ml : glucose 2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  12,5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,046 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1 g, bacto peptone 0,2 g, extrait de levure 0,2 g) sont rajoutés aux protoplastes qui sont incubés une nuit à 30°C. Des boîtes de sélection (milieu YM contenant de la phléomycine à 7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , boîtes carrées) sont préchauffées à 37°C. Sept et demi ml d'un mélange de top agar (Low Melting Point agarose 1% dilué dans un milieu YM contenant de la phléomycine 7 à 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) sont ajoutés au milieu de régénération contenant les protoplastes et sont versés sur les boîtes de sélection préchauffées. Quand la solution de top agar s'est solidifiée, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 4 jours. Les transformants sont alors transférés sur de nouvelles boîtes de sélection.

### ***4) Ciblage des transformants***

A partir de 16 g de mycélium, on obtient généralement de l'ordre de  $1$  à  $2 \cdot 10^7$  protoplastes. Le pourcentage de régénération est de 10 %. Concernant le vecteur pESC, les monokaryons ont été transformés avec le vecteur contenant le cDNA (BRFM 472, 473 et 474) ou le gène codant pour la laccase de *P. cinnabarinus* (BRFM 470 et 471) (Fig. 10). En parallèle, d'autres monokaryons ont été transformés avec les promoteurs pEGT (GPD11, 12 et 13) ou avec le vecteur pELP (12.3, 12.7 et 12.8) contenant le gène

codant pour la laccase (Fig. 10). Au vu des résultats deux transformants se dégagent du lot avec des activités équivalentes, les transformants 12.7 et GPD14. L'activité au cours du temps a été suivie pour les transformants GPD14 et 12.7 (Fig. 11). L'activité est détectable à partir de 3-4 jours et augmentent jusqu'à 12 jours pour atteindre approximativement 1200 nkatal/ml soit 72000 U/l avec ajout d'éthanol dans le milieu de culture.

### Légende des figures

**Figure 1 :** Isolement de souche monocaryotique déficiente pour l'activité laccase.

**Figure 2 :** Isolement du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* laccase.

**Figure 3 :** Etude en Southern blot du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*.

**Figure 4 :** Séquence du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*.

**Figure 5 :** Séquence de la séquence promotrice pLac du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* (jusqu'à l'ATG codant pour la méthionine de la laccase).

**Figure 6 :** Carte physique des trois vecteurs d'expression pEGT, pESC, pELP, utilisés pour la production de la laccase chez *Pycnoporus cinnabarinus*.

**Figure 7 :** Séquence nucléotidique du vecteur pEGT, contenant le promoteur du gène *gpd* (4480-5112), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène *sc3* (71-507).

**Figure 8 :** Séquence nucléotidique du vecteur pESC, contenant le promoteur du gène *sc3* (1-1033), un marqueur de résistance à la phléomycine (1540-2855) et le terminateur du gène *sc3* (1104-1540).

**Figure 9 :** Séquence nucléotidique du vecteur pELP, contenant le promoteur du gène laccase (4457-6983), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène sc3 (71-507)

**Figure 10 :** Résultats de production des transformants présentant les activités les plus importantes. La culture a été effectuée avec ou sans (témoin) éthanol.

**Figure 11 :** Suivi des activités laccase des transformants GPD 14 et 12.7 en fonction du temps avec ou (témoin) sans éthanol.

**Figure 12 :** Séquence du gène codant pour la laccase d'*halocyphina villosa*.

## REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'une protéine recombinante déterminée, ledit procédé étant effectué par surexpression du gène codant pour cette protéine déterminée dans une souche monocaryotique de champignons filamenteux de l'espèce *Pycnoporus* du groupe basidiomycète, et comprend :

- une étape de mise en culture de la souche monocaryotique de *Pycnoporus* susmentionnée, ladite souche étant transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée, dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant à un promoteur endogène des champignons susmentionnés, ou d'un promoteur différent (encore désigné promoteur exogène), ledit promoteur étant constitutif ou inductible,

- le cas échéant une étape d'induction du promoteur susmentionné, lorsque celui-ci est inductible,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la protéine recombinante déterminée, produite dans le milieu de culture.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée pour la surexpression du gène codant pour la protéine recombinante déterminée est telle qu'obtenue par mise en culture de la souche dicaryotique d'origine à 30°C dans le noir pendant 15 jours, suivie d'une étape d'exposition au jour 2 à 3 semaines à température ambiante jusqu'à la formation d'organes de fructification correspondant à des hyphes différenciées appelées basides, au sein desquels a alors lieu la caryogamie, suivie de la méiose qui conduit à la formation de quatre spores sexuées, ou basidiospores haploïdes génétiquement différentes, qui, après germination, engendre un mycélium monocaryotique.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est une souche de *Pycnoporus cinnabarinus*.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les protéines recombinantes déterminées surexprimées correspondent à des protéines endogènes de *Pycnoporus*, ou à des protéines exogènes, notamment à des protéines exogènes

correspondant à des protéines endogènes de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telles que les enzymes basidiomycètes intervenant dans les biotransformations végétales, ou correspondant à des protéines endogènes de souches de *Pycnoporus* différentes de la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production desdites protéines.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les protéines recombinantes déterminées correspondent :

- aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :

- \* les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,

- \* ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la  $\beta$ -glycosidase, l'invertase, ou l' $\alpha$ -amylase,

- aux protéines exogènes choisies parmi les suivantes :

- \* les tyrosinases de souches de *Pycnoporus* différentes de la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production desdites protéines, telle que la tyrosinase de *Pycnoporus sanguineus* lorsque la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production de cette tyrosinase est différente de *Pycnoporus sanguineus*,

- \* les laccases de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telle que la laccase d'*halocyphina villosa* (basidiomycète halophile),

- \* les cinnamoyl estérases A et B d'*Aspergillus niger*.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée marquée, notamment par un marqueur histidine.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant au promoteur endogène de cette laccase,

- une étape d'induction du promoteur susmentionné, notamment par addition d'éthanol, ou de sous-produits agricoles contenant de la lignocellulose comme la paille de blé, les sons de maïs et la pulpe de betterave, ou des composés à cycle aromatique comme la 2,5-xylidine, l'acide vératrylique, le guaïcol, l'alcool vératrylique, la syringaldazine, l'acide férulique, l'acide caféique et les lignosulfonates,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

9. Procédé selon la revendication 8, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase susmentionnée, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

10. Procédé de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus* selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur exogène choisi parmi :

\* le promoteur *gpd* de l'expression du gène codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 4,

\* ou le promoteur *sc3* de l'expression du gène codant pour l'hydrophobine de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 5,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

11. Procédé selon la revendication 10, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2 le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur exogène *gpd* ou *sc3*,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, de préparation de tyrosinase recombinante correspondant à la tyrosinase de *Pycnoporus sanguineus* représentée par SEQ ID NO : 16, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus* transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 15 codant pour la tyrosinase recombinante représentée par SEQ ID NO : 16, le cas échéant marquée, la séquence SEQ ID NO : 15 étant

avantageusement précédée par la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 128 et 190 de SEQ ID NO : 1 codant pour le peptide signal de *Pycnoporus cinnabarinus* délimité par les 21 premiers aminoacides de SEQ ID NO : 2, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la tyrosinase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 16 produite dans le milieu de culture.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, de préparation de laccase recombinante correspondant à la laccase d'*halocyphina villosa* représentée sur la figure 12 (SEQ ID NO : 18), caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique représentée sur la figure 12 (SEQ ID NO : 17) codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 18, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,
- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 18 produite dans le milieu de culture.

14. Séquence nucléotidique codant pour le promoteur *pLac* de la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, et correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3, ou toute séquence dérivée de ce promoteur par substitution, addition ou suppression d'un ou plusieurs nucléotides et conservant la propriété d'être un promoteur de l'expression de séquences.

15. Vecteur d'expression caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO: 3 du promoteur *pLac* selon la revendication 14.

16. Vecteur d'expression selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour une protéine recombinante déterminée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* selon la revendication 14.

17. Vecteur d'expression selon la revendication 15 ou 16, caractérisé en ce que la protéine recombinante déterminée est une protéine correspondant :

- aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :

- \* les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,

- \* ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la  $\beta$ -glycosidase, l'invertase, ou l' $\alpha$ -amylase,

- aux protéines exogènes choisies parmi les suivantes :

- \* les tyrosinases de souches de *Pycnoporus* différentes de la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production desdites protéines, telle que la tyrosinase de *Pycnoporus sanguineus* lorsque la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production de cette tyrosinase est différente de *Pycnoporus sanguineus*,

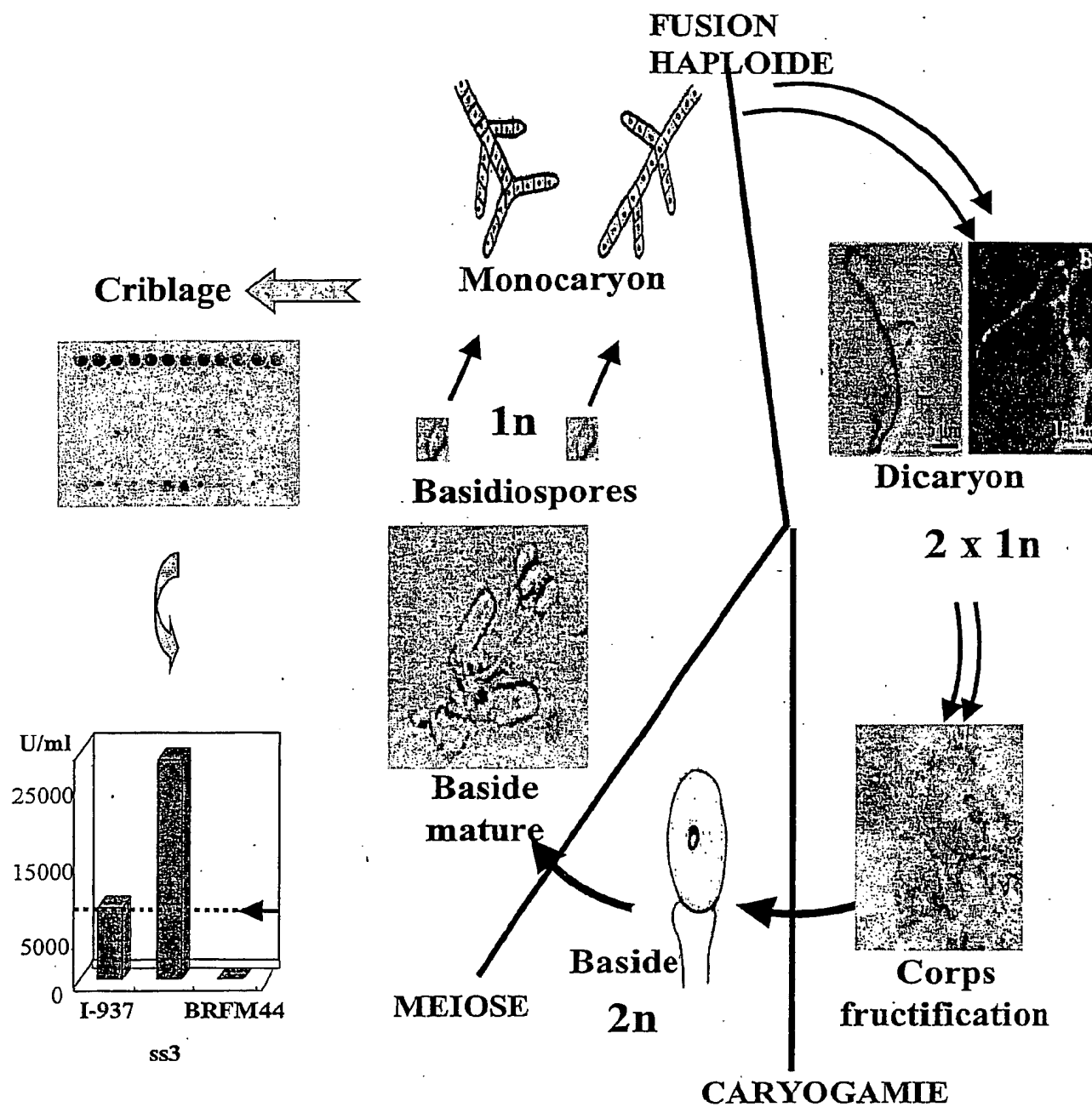
- \* les laccases de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telle que la laccase d'*halocyphina villosa* (basidiomycète halophile),

- \* les cinnamoyl estérases A et B d'*Aspergillus niger*.

18. Cellule hôte transformée à l'aide d'un vecteur d'expression selon l'une des revendications 15 à 17.

19. Cellule hôte selon la revendication 18, correspondant à des cellules monocaryotiques de souches de *Pycnoporus*, telles que les souches de *Pycnoporus cinnabarinus*.

20. Utilisation de vecteurs d'expression selon l'une des revendications 15 à 17, ou de cellules hôtes selon la revendication 18 ou 19, pour la mise en oeuvre d'un procédé de surproduction d'une protéine recombinante déterminée selon l'une des revendications 1 à 13.



**Figure 1 : Isolement de souche monocaryotique déficiente pour l'activité laccase**

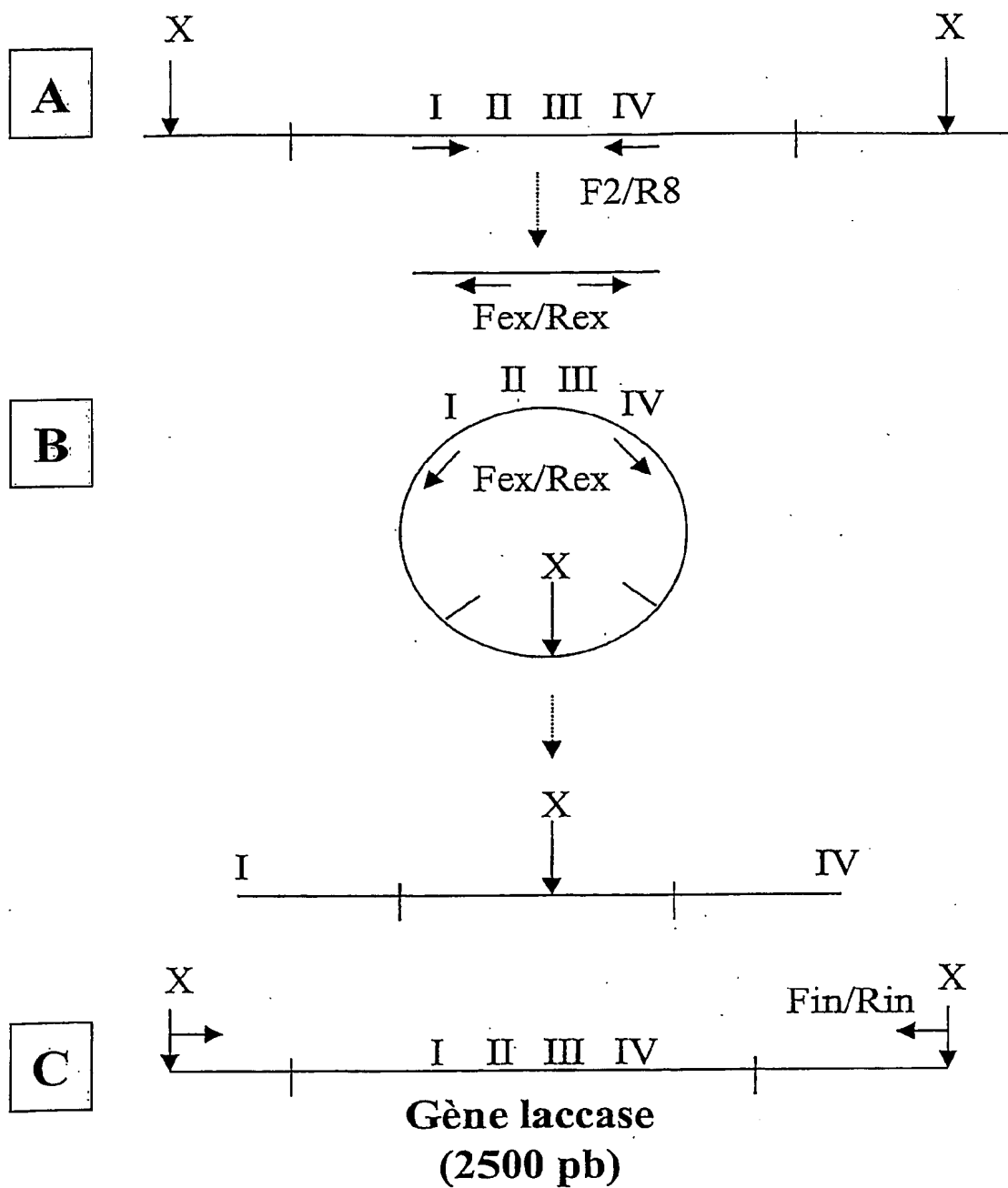
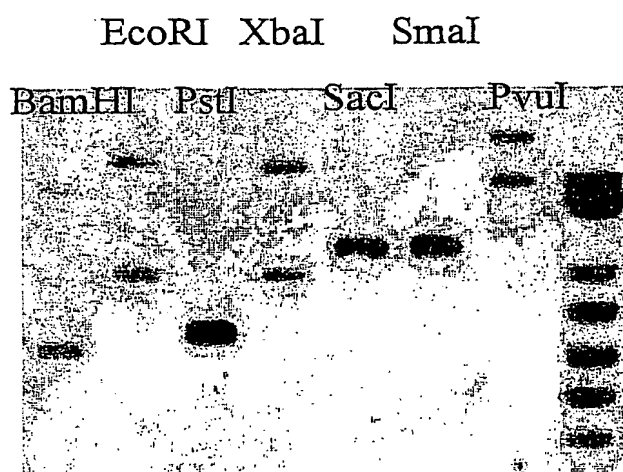


Figure 2 : Isolement du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* laccase



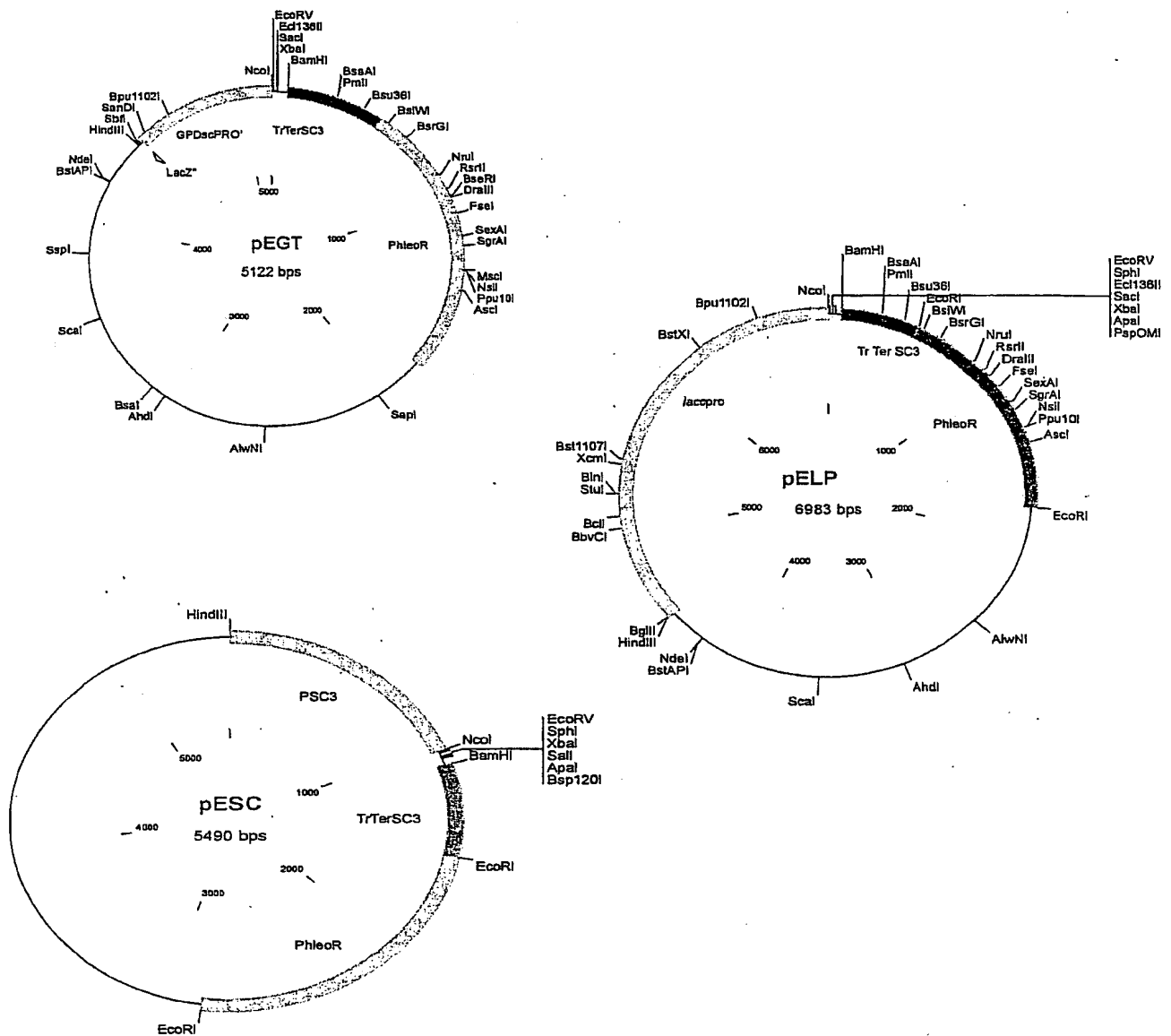
**Figure 3 : Etude en Southern blot du gène codant pour la laccase de *Pynoporus cinnabarinus***

CTGCAGACATCTGGAGCGCCTGTCTTTCCCTAGTATBAATGATGTCTGTCCGCGAGTCTTGAAGACCGCTCGAGTCCCACCTTGAGTTTATAGGTAGGAC	100
CTGTCCACCAAAACCCCTCTTCTGATCTCGAGGTTCAGTCCCTCTTCTTCTGCTCTCTGCTCTCCCTCACCCTGTGGCCCAACGACGCAATAGGGC	200
M S R F Q S L F F F V L V S L T A V A N A A I G P	25
CTGTGGCGGACCTGACCCCTTACCAATGCCAGGTGAGCCCGATGGCTTCGCTCGCGAGGCGCTGCTGGTGAACGGTATCACCCCTGCCCTCTCATCAC	300
V A D L T L T N A Q V S P D G F A R E A V V V N G I T P A P L I T	58
AGGCAATAAGTatgtatatgtcgtcgtccctcagagctacatacatctgatccacaatcgtttagGGCGATCGATTCCAGCTCAATGTATCGACGACG	400
G N K G D R F Q L N V I D Q	72
F2	
TTGCAAAATCATACCATGTTGAAAACATCTAGTATTgtaaggggttcagtttttccgactaceatgttattgaccatcaccactcgtag CATTGGCACGG	500
L T N H T M L K T S S I H W H G	88
(I)	
CTTCTTCCAGCAAGGCACGAACCTGGGCGGATGGTCCCGCGTTCGTGAACCAAGTGTCCCATCGCTTCGGGCCACTCGTTCTTGTATGACTTTCAAGTTCCC	600
F E Q Q G T N W A D G P A F V N Q C P I A S G H S F L Y D F Q V P	121
(I)	
GACCAAGCAGgtacgaattccgtacacgttttcattgctgcgaactaaacctctctactagGGACTTTCTGGTACCATAGCCATCTCTCCACGCAATA	700
D Q A G T F W Y H S H L S T O Y	137
(II)	
CTGCGATGGTTTGAAGGGGGCCCTTTCGTCTGCTACGACCCCAACGATCCTCACGCTAGCCTGTATGACATTGATAACGgtgagcagatcatggtatcgcaa	800
C D G L R G P F V V Y D P N D P H A S L Y D I D N D	163
tattgctccacttatgcttctctggcatccagACGACACTGTATTACGCTGGCTGATTGGTATCACGTTGCTGCCAAGCTCGGACCTCGCTTCCCgtac	900
D T V I T L A D W Y H V A A K L G P R F P	184
gtgtcaaatgtctacgagagatctcacatatacagactagactcacttcgtgattacagATTGGCTCCGATTCACCCCTTATCAATGGACTTGGTCSAA	1000
F G S D S T L I N G L G R T	198
CCACTGGCATAGCACCGTCCGACTTGGCAGTTATCAAGGTCACGCGAGGCGAAGCGgtaatgttggtggtcctcactgcacattggcctctgatacatgyc	1100
T G I A P S D L A V I R V T Q G K R	216
ctgtttccacagctACCGCTTCCGCTTGGTGTCTCTTCTGCGATCCGAACCATACATTACGATTGATAATCACACAATGACTATAATTGAGGCGGA	1200
Y R F R L V S L S C D P N H T F S I D N H T M T I I E A D	245
CTCGATCAACTCAACCCCTAGAGGTTGATTCAATCCAGATTTTGCGCGCAGCGCTACTCCTTCGTGgtagg tctgtaggctcctgtcatcaagtttg	1300
S I N T Q P L E V D S I Q I F A A Q R Y S F V	268
cagacattccttagatacacaccttttcaatgcagCTGGATGCTAGCCAGCCGGTGGTAACTACTGGATCCGCGCAACCCCTGCCTTCGGAACACAGGTT	1400
L D A S Q P V D N Y W I R A N P A F U N T G F	291
TTGCTGGTGAATCAATTCTGCCATCCTGCGTTATGATGGCGCACCCGAGATCGAGCCTACGTCGTCCAGACTACTCCTACGAAGCCTCTGAACGAGGT	1500
A G G I N S A I L R Y D G A P E I E P T S V Q T T P T K P L N E V	324
CGACTTGCATCCTCTCTCGCCTATGCTGTGgtacgtgtctcaagaacccctcgatcactaagtgcaggtcactatggtgcatgacagCCTGGCAGC	1600
D L H P L S P M P V P G S	337
CCCGAGCCGAGGTGTCGACAAACCTCTGAACCTTGGTCTTCAACTTCgtgagtaactggcgcgcttccgtagcacacgttcgaacaaagcctgataccat	1700
P E P G G V D K P L N L V F N F	353
gcagAACGGCACCAACTTCTTCATCAACGACACACCTTGTCCCGCGCTGTGTCCGACTTGTCTACAAATCCTCAGTGGGGCGCAGGCGGCTCAGGAC	1800
N G T N F F I N D H T F V P P S V P V L L Q I L S G A Q Q D	385
CTGGTCCCGGAGGGCAGCGTGTCTTCTTCCAGCAACTCGTCCATTGAGATATCCTTCCCTGCCACTGCCAATGCCCTGGATTCCCCCATCCGTTCC	1900
L V P E G S V F V L P S N S S I E I S F P A T A N A P G F P H	419
(III)	
ACTTGCACGGTgtacgtctgccttccctcgtctaaaggcggagtcgatctctgactcccatcacagCACGCCTTCGCTGTCTGTCGGGAGCGCC GGGAGC	2000
L H G H A F A V V F S A G S	433
(III)	
AGCGTCTACAACTACGACAACCCGATCTTCCGCGAGCTGTGTAGCACCAGGCGAGCCGCGGACACACGTCACGATTCTGCTTCGAGACCAATAACCCAGGCC	2100
S V Y N Y D N P I F R D V V S T G Q P G D N V T I R F E T N N P G P	467
R8	
CGTGGTTCCTCCACTGCCACATTGACTTCCACCTCGACGAGGCTTTGCTGTAGTATGGCCGAGGACACTCCGGACACCAAGGCCGGAAC CCTGTTCC	2200
W E L H C H I D F H L D A G F A V V M A E D T P D T K A A N P V P	500
(IV)	
TCAGCGGTGGTGGGACTTGTGCCCCATCTATGATGCACTTGACCCAGCGACCTCTGAGCGGATTTGTACTGTGACCTGGT GTGGGGGAACATGTGCA	2300
Q A W S D L C P I Y D A L D P S D L	518
GGGCTTTTCATCGATCAGGGACTTTCAAGGTTGGCATATATACCTACAGGCTGACTCGGACAGCGTGTGGGCGTGGGTGTACTCTGCTTGTATGT	2400
TGAAAAAAGGATTTATGTAGAACAATTTATGAGCAATCAGCAATCAATAGGATTTGTGTCGGTTTCGACGAAATGTCTTGTCTCCCTGACATTACTTTTG	2500
TGCGAGAAATGGGTCCATGATACACATCATTTGAGCTCTCAATACCAAGAAGGATTACCCATGTCAATACCCAAGATCATGTCTTCGCTGTCCGCAATGG	2600
TCTCATGTTGCGTTGAGCAGATCGCAGTACGTTGAAANGCGATTAGTAT TACATGCAACATGCAACATTGGAAGGGGSCATGACAGGTTTCAGCTCGCG	2700
TCAGTCGGCCAGTAGCGACCTTTGCGCGACTGCCTGTAACTGAACGTATGCTTCAGAACTCCGTCGGTATCGAGAGCGATCGTGTACGTTCCGGGAT	2800
AGATCCATTGATCCCCGCTCTGGTGGGCGGTCGATGGCCCCGAGCGTCACCGGACGTTTCGCGATCGCGCTTTTCTAGGGGCGAGGCCGTGTACCCG	2900
CGTGTACGAGACGAGCTGCTTGTTCGGGTGGGGCGAAGGCCGGAAGGAGCCACTCACGAAGAGCAATGCGACGTAATCCGAGGTAGCCTTGCCCGTGTTA	3000
GTCACACGCACGGGAACGTGTCTGAGCGGCGC GAGGTGAGGAAGGCGGCGCTCTTCTGACCGCGCTGTACGAGGTGCGAAATCGAATACGTGATGGCG	3100
GTCTCCAAAGTCCGTGACGTTGGTGTGATCGGCGCGCGCGCTGGAGCTGCCAAGAGAAATCGAAGGTGGTGAAGTGCAGTCCAAGGCCAAATTCGTA	3200
GACCGGCTGCGCGGTGTACCACTTGTATGTACGCCCCGGGTCGACGCGCTTGGGCGAAGGCT CATGTGAGTCATCGGAACCTGATCAGCGTATAGTGGCT	3300
GGGTATTGGGTGATGGGCAGGCGTCTGTGACG	3331

Figure 4 : Séquence du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*

AGATCTCCGAACCAGAAATGCGATTGCGTTGAGGCCCAATTAAGAATAAAGCTGCGTCAGGGCAGCGACGTA  
 TCTTGATCCATCATTGACTCACCGGCATCGGCGTCAACACCAAAGCAAGCTCGTCCCACCCATAGGCGTGCA  
 CCGGCCGGCGTGCGCCATTGAGGTACATGAGCGGGGCGAAAGTCCGCCATTGGTAGCCCTGTCTGCGGACGCG  
 CGGCGATGAAACGTTTCCCACCATTGGGAAGAAACGTCTGCGGCCCATCATCCCTTCACCGGATGACAAGGC  
 GCGTTCGCGCCTTTGCCGCAGAGGCCGCGGGCGACATGCACAGCGAAGGTCCGTTGCGGATGGGAAGCAGG  
 CAATCAGTGGGTGTCTACGCCGCCACGATGGTTCGGGGAGCGTAGGCGCCCTCCCATAAGGCGGCAAGCATC  
 ATGATGCTCTCCGATTCGGGAAGCCTGGTGCATGCTGGAGAGACTCTCTCCGAGAGACCAGTGTGCGCAAC  
 GTTCCTGGCCTGGAAGACTTTAAAGTGAGTGTAAGGGCGAGCAGAGGACGATCATCGGATTGCAGGAACC  
 ATCGGCATCCTCAGCCTGGGAAGGATGGCTCTTGGTAGACATTGCGCGGAAGGTGTCTAGATGTGAGCGGGC  
 TTCTTGGATGATCATGTCTGTAACTTTTTCTGACCTCGTTCGGTGGTACGCATGGCAGGATTGAGCATTACGGT  
 ATGCCCTCCCATTCATAAACGATAACCCCTTCCTTCAGGTTGGTCATCTCCATAGAGCGGCACGCTCTCAAGG  
 CCTAGGCTATTACACCTCCTTCGCAACATCCCTATTACGGTGTCTGTAAGGAACGACTTGTCTATGGGATC  
 ACATGAAGTGCAGCATACTGTTCCCGGTCTCGCAGTACAGACGCTAGTACGGGAAGTCGACATCCAAGCGT  
 TCAGTCACCACATGGCAAAAAAGCTGCACCATACTCTTTATGGTGAGTTGTTCTGAGTGGTATACAGTCAT  
 TCATGAGGGAATGCCACCGGATAGGGTGTGGCGGCCGCAATATTCATCGCCTGGCAATAGTCGATGTGCGT  
 CTTTGTCAATGAATATCATGGGTACATGTGGGAGACGGTTAAACAGCGTTGACTGTGAATCCCTGGTGTGT  
 GTTGGGCCGAACAGGTACGTTGCAGGAACACCAATATCTCTTCGGCAGCCAGTTCTTTGCGAGCGGCACAG  
 GCAGGCATCGCGCAACAGATCCCAGCCATCCGGCCTCTGAATTTCGGGATACCTGAAGCCCTTCAGGTACGG  
 AGCGAAGAGGTGGGCTCTCTGCAGCGATTGGCGGACGGATAGCTGTATTTCTCTCTCACCATTGGGAAGAT  
 GTGAAAGGCTCCATCATATAGCGGCTCAACTCTACCTCGAATGTCCAAACACGGCGGGAATACTTATTTATG  
 TGGACAAGGCCGAGCTATGATAGCTTGCTCCCGAAGTTGGTAAGTCCCGCAATCTGCGGTTTCAGGCAACAGT  
 CTCGGAAAAATAAGAAGAATATTGTAGGTGCGTGTAGGCGTATCGCCCAAATGCGCACACACGGAGGCTTTA  
 GGAGATGAAGCGCCCGTGAGCGGTAAGGGAGTTGGTTCACCGCCGCCCGACCGACTCTCTCTCTTTCCCAG  
 CATCATGTCTCGGCGCAAACCTTTACCCTCTATTGACCAACTCCACGAGAAAGCAGGAACAGCTTCCTTGTCT  
 CTCATGAGCTCCGCAATCCAGACCTTAGCCGGTTGCTTACTCATCGTTATCCCTGCCGCCATGGTAGTGGA  
 GTCAGCCTGGCCAGTGCGTAGTCCCCTCTCTCTTGTCTGCACTAGAGAAGCCCCATGAGACAGCGTTTTTTGC  
 TTTATTTCTGCTGTTTCTATAGACACCATAGGGGGCAAACGATCCTGCACGCCCAGAGGTATTGGGCTCGTCA  
 GATTCACAGTTTTTCTCCTCGGTCTGAATCGGCTGCACGGCAGATAAATCGGCCGGAATGCTATAGCCCTT  
 CATAGCCCGCTATGAGAGTCGCAAAAGGCTTGTCAGTCAGGTCGGTCGAGTGGCTCTCACGAAGAGCGTCAA  
 CTTTCGCGGACAGCCGCCCTTTCAGGGCAAGATAGATCCTCCCATCATCCCTACTGCGCTCAGCGCCGGTAC  
 CGAACAAATTGACTTACCGACATCCTCCGGGACGCGCAAATGCTGTTTCGACGGAACGTAATCCTCTTCGTCCC  
 GCCTCTTTTCGCTCTCACGCATTCCGTGTGGTTTCGCGGACGCGCCGCTCATCAGGACCAGACCAGTCTCAAT  
 GTCTGGTACCGGCACAATGGTGACACTGCGGCAACTGAGTAGGTCTGGTCACTCTGGTGCACCGTCGCTTAC  
 GCTGACCTTCGGGATACTGTCTGCAGACATCTGGAGCGCCTGTCTTTCCCTAGTATAAATGATGTCTGTC  
 CGCAGGTCCCTGAAGACCGCTCGAGTCCCACTTGAGTTTTAGGTAGGACCTGTCCACCAAACCCCTCTTTCT  
 GATCATG

**Figure 5 : Séquence de la séquence promotrice du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* (jusqu'à l'ATG codant pour la méthionine de la laccase)**



**Figure 6 : Carte physique des trois vecteurs d'expression utilisés pour la production de la laccase chez *Pycnoporus cinnabarinus***

CATGGGATATCGCATGCCTGCAGAGCTCTAGAGTCGACGGGCGCGGTACCGGGCGCGCTTAAGACGCGTGGATCCGCAGGTGAAC  
 GCGCCTATCGGTGGGATATTGGGCGACGGGAGCCTCGGCAATCTGAGCCTCGTACTGCCTAGCAAAATTCGGAATCCCTTCGATGT  
 CATAGGGTCGCGGACAAGTCGTCTTGTACATACTCCAAGGTGTTGACTCATTCCTCGATAATGAACATTGTTGTTGTTGTTG  
 TTCTCTATCCGCTCAGTCACGCGACCCACACGTGCATGGTTGAACCTTCGCCACGCAACAACCGCATGACGACATGGCGAACCTAAG  
 TAAAGGCTGAGTCGTGGACTAAAGCACTCCACTTTACGGCGAGGATGCCAGTCTACGTCAATGAAGCCTCAGGTCCCGAAGTAA  
 GGGGGTACAAAAGGAGGGGTGAAAGGTGGACGTTTTCTTACCATCCTTCCACCTCCAGACCACCATGCCGGGAATTCCCAGCTTGTCT  
 CAAAAGGTTCTGCCGTACGCCCGGAAAATTCCTTCGAGGTGGGCCCTATCGCATACATGCACGACTTCAAAACAATCCATTCTATC  
 ATTTTGGGATCGTACAATTATTAGACATGTTGTACAACGTTACATTCCTTTCTTCTTTACTCTCCGCGCCAGTCTATGTAGAGGTAAA  
 GTACAAGCGTCCAAAGGATCAGGCACCTAGAGCGCGCGCTTGTCTCGCCGCTTAGAGCGCGCGCTCTGCTTCGCCGCTAGACG  
 AGCAGGTGCGACACGCGGGAGTAGCCCCACTCGTTGTCGTACCAGGCAATGAGCTTCACGAAGCTTGTGTATCGCGATGCCG  
 GGGATCGATCGACGCGCTTAAGGCGCGCGGTACCCCTCGGACCCGTCGGGCGCGCTCGGACCGCGCGTGTGGTCGGCGTCGG  
 TCAGTCTGCTCCTCGGCCACGAAGTGCACGCAGTTGCCGGCGGGTGCAGCAGGGCGAACTCCCGCCCCACGGCTGCTCGCCGAT  
 CTCGGTATGGCCGGCGGAGGCGTCCCGGAAGTTGCTGGAACGACCTCCGACCACTCGGCGTACAGCTCGTCCAGGCCGCGCAC  
 CCACACCCAGGCCAGGTTGTTCGGCACCACTGGTCTGACCGCGTGAACAGGGTACGTCGTCGCCGACCCACACCGGC  
 GAAATCGTCTCCACGAAGTCCCGGAGAACCCGAGCGGTCGGTCCAGAACTCGACCGCTCCGGCGACGTCGCGCGCGGTGAGCA  
 CCGGAACGGCACTGGTCAACTTGGCCATGCATGGTGTATGGGCATTATGTGTATGGGATGCGATGGGAGAGGGAAAGTCTCTGATG  
 GGAGTGTGGAGAAAGAGGGAGACGGCGGGCGCGCGCTTTATACCCACGCGCGAAAGATCCGATCGATACTGACAAAACGGGA  
 TGAACACATCGCGCGCGCGCTGGACTGCGCGCAATCTGCAAAATGCCAGGCCAGTCCCGTCCGGCGGCCACCGCATGAGT  
 CCCCCTCGAGGGCGACGCTCTATTCTATCCATGCGCGCAATTGCAGGTGCGCGGTGGAAGAACAGTCTTCGAGTCTCTCTCGCAC  
 TGGGCTGCGACCTGTCTACCTCTCATCTAACCCCTCCGCGGCTTCGACGATCAGTTACTAATCTCACACCGAAGAGGCTCTCGCG  
 CACCCTCCGATCCCGAGCAGTTCCTTACATGCCACAGCGTCAGAAATGAACACAATGCACGTCARATCAGATCCCGGGAATTCGT  
 AATCTAGTCTAGCTGTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTACAAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAG  
 CCTGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCGCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCT  
 GCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCGCTTCTCGCTCACTGACTCGTGGCGTGG  
 GTCGTTCCGCTGCGCGGATACGCTCACTCACTCACTGCGCAATGCGGTAATCGGTTATCCACAGAATCAGGGGCAATACGAGGAAAGAA  
 CATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACG  
 AGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTCTGGAAGCTCC  
 CTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGTAACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTC  
 ACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCGTTGAGTTCGTTCCGTTCAAGTTCGTTGCGGTAATCGGTTATCCACAGAATCAGGGGCAATGATACCGGC  
 TTATCCGGTAACATCTGTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAAGGATTAGCAGA  
 GCGAGGTATGTAGGCGGTCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCT  
 CTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGTCTTCCGTAAGTTCGCGCAAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTT  
 TGAAGCAGGATTAACCGCGAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAA  
 AACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTAACAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAA  
 TCTAAAGTATATAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTT  
 ATCCATGTTGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATTAACATCAGTACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCG  
 AGACCCACGCTACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATC  
 CGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCT  
 ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCACTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCA  
 TGTGTGCAAAAAAGCGGTAGTCTCCTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAAGTAAAGTGGCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGC  
 AGCACTGCATAATTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCACTCTGAGAATAG  
 TGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGTCTCATATT  
 GGAACAGCTTCTTCGGGGGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTGTCACCCCACTGA  
 TCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGAC  
 ACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTG  
 AATGTATTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGCAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTAATATCA  
 TGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACAGAGGCCCTTTCGCTCGCGGCTTTCCGTTGATGACGGTGAAGAACCTCTGACACATGC  
 AGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGG  
 TGTCCGGGCTGGCTTAATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCATATGCGGTGTGAAAATACCGCACAGATGCGTA  
 AGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTGCCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGCTCTTCGTTATTA  
 CGCCAGCTGGCGAAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTACGACGTTGTAAACGAC  
 GGCCAGTGCCAAGCTTGATGCTGACGCTGACGACCGAGCGCGGCCACCCAGCCTATCCCGCGCGGGTCCGGACCCAAAAATAA  
 GCGGGCCCCCGCGCGCCCGTCCGGCGAGCGGGTGTATCTACGAACGGAAGTGGGAGGCGACTCGGAAGAGTTTGGTTAGAAAGGG  
 GAACACCATCGCGGACGCCAGTGTCTGGDCAGCTGAGCGTGCATTGTGTTCAATTCTGACCTGTGGCATGTAAAGGAACGTGCTC  
 GGAATCGGAGGGTGGCGGAGAGCCTCTTCGGTGTGAGATTAGTAAGTGTACTGCGAAGCCGCGGAGGGGTAGGATGAGAGGTAG  
 ACAGGGTTCGACGCCAGGTGCGAGAAGGACTGCGAAGGACTGTTCTTCGACCGCGCACCTGCAATTGCGCGCATGATAGAAATAGA  
 CGCTCGCCTCGAGGGGAGTCTGACAGGGCTGGTGGCGCCCGGAGGACTGGCTGGGCAATTGTCAGATGGCGCGCAGTCCAG  
 GCCCGCGCATGTGTTTCATCCCGTTTGTGTCAGTATCGGATCTTCGGGCGTGGGTATAAAGCGCGCGCGCTTCCCTCTCCCT  
 CTTTCTCCAGCACTCCCATCCAGAGCACTTCCCTCTCCCATCGCATCCCATCACACAATAATGCCCATCAC

Figure 7 : Séquence nucléotidique du vecteur pEGT, contenant le promoteur du gène *gpd* (4480-5122), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène *sc3* (71-507).

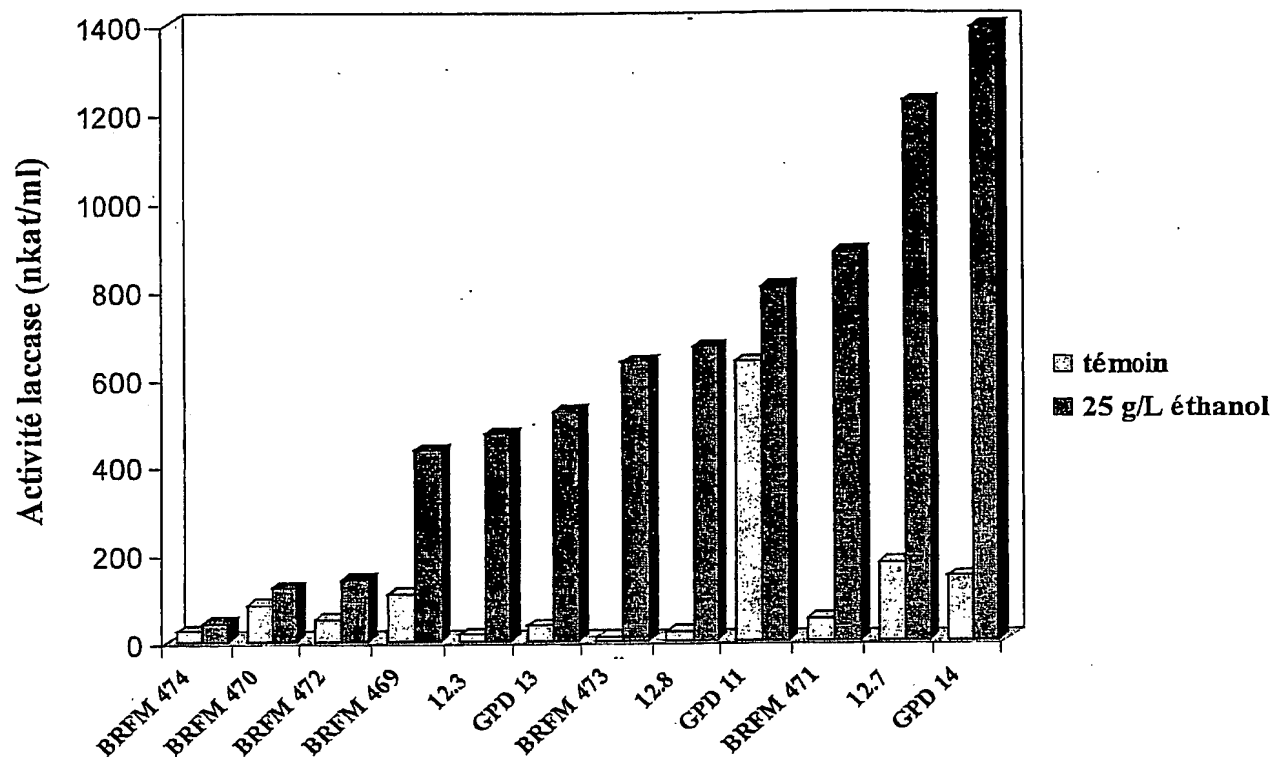
AGCTTCTCCGGCCCCGAATCGAACGGCAGGATGTGTGGGCGTGTCCAATATTGCCATGAAAACTGTGCAGAAGTGAACCCCTCTCGTCAC  
 CCTGTACAGCTTCGCTGAGTTGAAAAAGCAGGGTTCACTTGGGGTCACTGATGCAGCTCGACCGGAGAACTAAATGACCAGCCGG  
 AGTGTTCACCTAACTAACGCCGGGTATTACAGGGCAGCTTCTCTATGTTGCGCTACGACGTAGATCACCGCCCATGAACGGGGGAAACG  
 GGGAGGGGTGCGTTTGGTACGCTTTACGCTCTGGCTATGTTGTATTGACAGCGCTCTGCAGAAATGATGGGCACGACGATGCGCCGAGCCG  
 GCCAGTGTGTCGGATGTCCACTGTTGAGGCCATCCTTTTCTAGACAGACGGAAGAGCTTTGGAGGTGCGATTCTCTACGAATGGGA  
 AGGGGCTTAGATGGAGAGTGACACGCTCTGAGCTCCCCAACACGCTTCGCCGAGGGTGCCTCTCCGCGGACATTCACTCAGTTCAATTG  
 TTCTGACCTGCCTAATTGTATAGACCGGCCAACAACTTGTGACGCCCCATCATAACAGTGCCTGACAGAGCCTTCCCACTCAGTCCG  
 CGCTCCCTCAATCAATCCCACTAACTCGCCGGCTCTGCCCTTTCGCCGCTCGACACGCTCGCTTGAAGAGCCCGGGACAGGGCGTCCGC  
 TCCCCCTTCCCTCCGCTGCTCATGCACGACGCTTAATGTTGCTCAGGCGAGCCGTAAGTATATTCAAAGGCGTAGGGAATGAATGAGG  
 CAGGCGCGCGGGGACCTGGCACGCGCGGCATGAACATGCAGACTTGGGTGACGATAACTTGAACCTCAGACGCGCGCAATGAATATCCA  
 AACGCGCGGGAAGAAAAATAATTTACGGGAGCCTCCOCAGGTATAAAAGCCCTCACCCGCTCACTCTTTCTCCAGTCGAACACCCCACT  
 TCAACTACCCAGCCCTCTCTTCTTCGCTATCTTCTTCAACCTGCTCGCCATGGGATATCGCATGCCTGCAGAGCTCTAGAGTCGAC  
 GGGCCCGGTACCGCGCCGCTTAAGACGCGGTGATCCGCAAGGTGAACGCGCTATCGGTGGGATATTCCGGCGACGCGGAGCCTGCGG  
 AATCTGAGCCTCGTTACTGCCTAGCAAAATTCGGAATCCCTTCGATGTCATAGGGTCCGCGACAAGTGATCGTCTTGCTACATACTCCAAG  
 GTGTTGACTCATTCCTCGATAATGAACATTGTTGTTGTTGTTGTTGTTCTCTATCCGCTCAGTCACGCGACCCACACGCTGAGTTGAAC  
 TTCGCCACGCAACAAACCGCATGACGACATGGCGAACCTAAGTAAAGGCTGAGTCGTGGACTAAAGCACTCCACTTACGGCGAGGATGC  
 CAGTCTACGTCAATGAATGAAGCTCAGGTCCGGAAGTAAAGGGGTACAAAAGAGGGTGAAAGGTGGAGCTTTTCTACCACTCCCTTCCA  
 CCTCCAGACACCATTGCGGGGAATTCAGCTTGTCTCAAAAAGGTTCTGCCGCTACGCGCGGAAATTCCTCGAGGTGGCCCTATCG  
 CATACATGCACGACTTCAAAACATCCATTCTATCATTTTGGGATCGTACAATTATTAGACATGTTGTACAACGTTACATTCCTTCTCTT  
 TTAATCTCCGCGCCAGTCTATGTAGAGGTAAAGTACAAGCTCCAAAGGATCAGGCACTTAGAGCGCGCTCTGCTTCGCGCTTAG  
 AGCGCGCGCTCGCTTCGCGCGGTAGACGAGCAGGTCGCGAGACAGCGCGGAGTAGCCCACTCGTTGTGCTACCAAGGCAATGAGCTT  
 CACGAAAGCTCTTGCTGATCGCGATGCGGGGATCGATCCACGCGCTTAAAGGCGCGCGGTACCCCTCGGACCCGTCGCGGCGCGCTC  
 GGAACCGCGGTGTTGGTCCGCTCGGTGTCAGTCTCTCTCGGCCACGAAGTGACGCGAGTTGCCGCGCGGTGCGCGAGGGCGCAACTC  
 CGCGCCCCACGCGTCTCGCGATCTCGGTCACTGCGGCGGAGGCGTCCCGGAAAGTTGCTGGACACGAGCTCCGACCACTCGCGCT  
 ACAGCTCGTCCAGGCGCGCACCCACACCCAGGCCAGGGTGTGTCGCGCACCACTGGTCTGGACCGCGCTGATGAACAGGGTCACG  
 TCGTCCCGGACCAACCGCGCGAAGTCGTCTCCACGAAGTCCCGGAGAACCCGAGCGGTGCGTCCAGAACTCGACCGCTCCGCGGAC  
 GTCGCGCGCGGTGAGCACCGGAACGGCACTGGTCAACTTGGCCATGTCATGGTGATGGGCATTATGTGTGAGGATGCGATGGGAGAG  
 GGAAGTGCTCTGGAATGGGAGCTGAGAGAAAGAGGGGAGACGGCGCGCGCGCTTTTATACCCACGCGCGAAAGATCCGATCGGATA  
 CTGACAAAACGGGATGAACACATCGCGCGCGCGCTGGAAGTGCAGCCATCTGCAAAATGCCAGGCCAGTCCGCTCGGGCGCCACCA  
 GCCTGTGTCGAGTCCCGCTCGAGGGCGACGCTCTATCTATCCATCGCGCAATTCAGGTGCGCGGTGCAAGAACAGTCTCTCGCAGT  
 CCTTCTCGCACTGCTGCGCTGCTACCTCTCATCTCACTCCGCGGTTCGCGAGTACAGTTACAGTTACAGTTACAGTTACAGTTACAG  
 GCTCTCGCGCCACCTCCGATCCCGAGCACGTTCTCTACATGCCACAGCGTCAGAAATGAACACAATGCACGTCARATCAGATCCCCGG  
 GAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATTCACACACAATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG  
 TAAAGCTTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTACATTAATTCGTTGCGCTCACTGCCGCTTCCAGTCCGGAAACCTGTGTCGCCA  
 CGCTCTAATGAATCGGCAACCGCGCGGGAGAGCGGTTTCGCTATTCGCTTCCGCTCTTCCGCTCTCTCGCTCTCGCTGCGCTC  
 GGTCGTTCCGCTCGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCGAGGAAAGAAC  
 ATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAGAGCGCGGTGCTGCGCTTTTCCATAGGCTCCGCGCCCTCGCAGC  
 ATCACAACAAATCGACGCTCAAGTCAAGGTGGCGAAACCCGACGACTATAAGATACCAAGGCGTTTCCCTCGGAGCTCTCGCTG  
 CGCTCTCGCTTCCGAGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCTCTTCCGGAAGCGTGGCGCTTCTCA TAGCTACGCTGTGA  
 GGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGACGAAACCCCGCTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTATCCGGTA  
 ACTATCGTCTTGAGTCAACCCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTA  
 GCGCGTGTACAGTTACTTGAAGTGGTGGCTCACTACGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTCGCTGAAAGCGAGT  
 ACCTTCGGAACAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACG  
 CGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAAGATCCTTTGATCTTTTACCGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTACGTTAAGGGATT  
 GGTATGAGATTATCAAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTAAATTAATAAGTGTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAAC  
 TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTTACCTCACTAGTTGCTGACTCCCGTC  
 GTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTACCCGGTCCAGATTT  
 ATCAGCAATAAACAGCCAGCGGAAAGGGCCGAGCGCAAGGTGCTGCACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC  
 .GGGAAGTGAAGTAAGTGTGCGCAATTAATAGTTTGGCGCAAGCTGTTGGCATTTGCTACAGGCATCGTGGTGTACAGCTCGTCTGTTG  
 GTATGGCTTCACTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAGCTCCTTCGGTC  
 CTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAAATCTCTTACTGTATGCCATCCGT  
 AAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCACTTCTGAGAATAGTGTATGCGCGGACCGAGTTGCTTTCGCCGCGCTCAAT  
 ACGGATAAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAAGTGCTCATCTTGGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTAC  
 CGCTGTTGAGATCCAGTTGATGTAACCCACTCGTGCACCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA  
 AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATCTCTTCTTTTCAATATTATGA  
 AGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAATAAGGAGTATGAGTAACTTCCG  
 CGAAAAAGTCCACCTGACGCTTAAGAAACCATTAATATCATGACATTAACTATAAAAAATAGGCGTATCAAGAGGCGCTTTCGTCGC  
 GCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACTCTGACACATGACGCTCCCGGAGACGGTCAAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGAC  
 AAGCCCGTACAGGGCGCTGACGGGTGTTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTAACTATCGCGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGAC  
 CATATGCGGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTGCGCAATCAGGCTGCGCACTGTTGGGA  
 AAGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGT  
 TTCCAGTCACGACGTTGTAACACGACGGCCAGTGCCA

Figure 8 : Séquence nucléotidique du vecteur pESC, contenant le promoteur du gène sc3 (1-1033), un marqueur de résistance à la phléomycine (1540-2855) et le terminateur du gène sc3 (1104-1540)

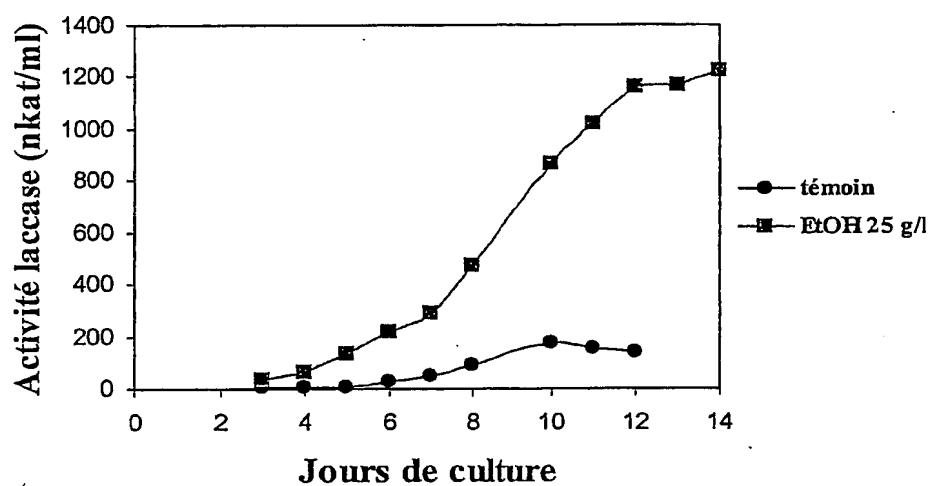
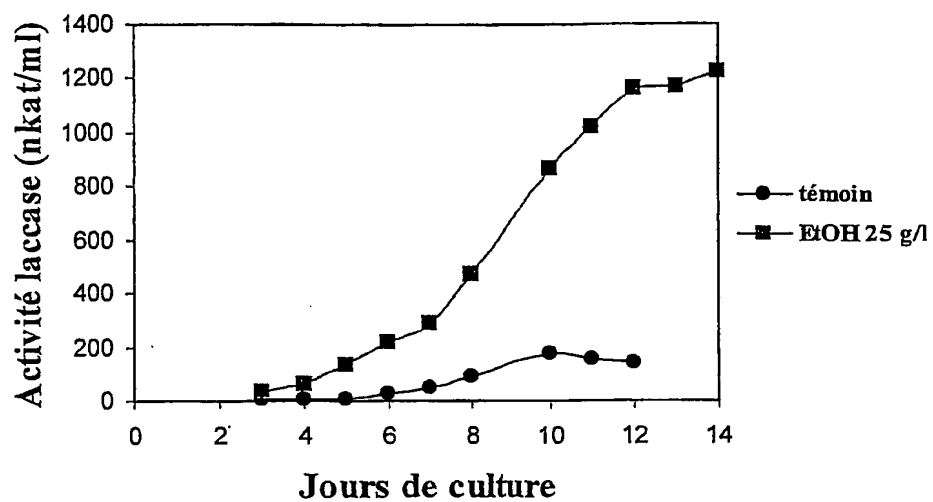


CAGCGAAGGTCCGTTGCGGATGCGGAAGCAGGCAATCAGTGGGTGTCCTACGCCGCCACGATGGTTCGGGGAGCGTAGGGCCCTCCCA  
TAAGGCGGCAAGCATCATGATGCTCTCCGATTTCGGGAAGCCTGGTGCGATGGTGGAGAGACTCTCTCCGAGAGACCAAGTGTGCGCAAC  
GTTCTTGGCCTGGAAGACTTTAAAGTGAGTGTAGAAGGGCGAGCAGAGGACGATCATCGGATTGCAGGAACCATCGGCATCCTCAGC  
CTGGGAAGGATGGCTCTTGGTAGACATTTCGCGGAAGGTGTCCTAGATGTGAGCGGGCTTCTTGGATGATCATGTGCTAACTTTTCTGA  
CCTCGTCGGTGGTACGCATGGCAGGATTGAGCATTACGGTATGCCTCCCATTCATAAACGATAACCCCTTCCTTCAGGTTGGTCATCTC  
CATAGAGCGGCACGCTCTCAAGGCCTAGGCTATTCCACCTCTTCGCAACATCCCTATTACGGTGTCTGTAAGGAACGACTTGTTCAT  
GGGATCACATGAAGTGCAGCATACTGTTTCGCCGGTCTCGCAGTACAGACGCTAGTACGGGAAGTCGACATCCAAGCCTTCAGTACCA  
CATGGCAAAAAAGCTGCACCATACTCTTTATGGTGAGTTGTTCTGTGAGTGGTATACAGTCATTTCATGAGGGAATGCCACCGGATAGG  
GTGTGGCGGCCGCAATATTCATCGCCTGGCAATAGTCGATGTGCGTCTTGTTCATGAATATCATGGGTCACATGTGGAGACGGTTAA  
ACAGCGTTGACTGTGAATCCCTGGTGTGTGTGGGCCGAACAGGTACGTTGCAGGAACACCAATATCTCTTCGGCAGCCAGTTCTTTG  
CGAGCGGCACAGGCAGGCATCGCGCAACAGATCCCGAGCCATCCGGCCTCTGACATTTCGGGATACCTGAAGCCCTTCAGGTACGGAGC  
GAAGAGGTGGGCTCTCTGCAGCGATTGGCGGACGGATAGCTGTATTTCTCTCTCACCATTGGGAAGATGTGAAAGGCTCCATCATAT  
AGCGGCTCAACTCTACCTCGAATGTCCAAACACGGCGGGAATACCTATTTATGTGGACAAGGCCGAGCTATGATAGCTTGTCTCCGAA  
GTTGGTAAGTCCCGCAATCTGCGGTTTCAGGCAACAGTCTCGGAAAAATAAGAAGAATATTGTAGGTGCGTGTAGGCGTATCGCCAAA  
TGCGCACACACGGAGGCTTTAGGAGATGAAGCGCCCGTGAGCGGTAAGGGAGTTGGTTACCGCGCCCGCCCGACCGACTCTCTCTTT  
CCCAGCATCATGTCTCGGCGCAAACTTTACCCTCTATTGACCAACTCCACGAGAAAGCAGGAACAGTTCTCTCTCATGACGTCC  
GCAATCCAGACCCCTTAGCCGGTTGTTACTCATCGTTATCCCTGCCGCCATCGTAGTGGAGTCAGCCTGGCCAGTGCCTAGTCCCGTCT  
CTCTTGCTGCACTAGAGAAGCCCCATGAGACAGCGTTTTTGTCTTATTTCTGCTGTTTCTATAGACACCATAGGGGCAAACGATCCTG  
CACGCCAGAGGTATTGGGCTCGTCAGATTCCAGTTTTTCTCTCGGTCTGAATCGGCTGCACGGCAGATAAATCGGCCGAAATGCT  
ATAGCCCTTCATAGCCCGCTATGAGAGTCGCAAAAGGCTTGTCAAGTCAGGTCGGTCGAGTGGCTCTCACGAAGAGCGTCAACTTCGCG  
CGACAGCCGCTTTTCAGGGCAAGATAGATCCTCCCATCATCCCTACTGCGCTCAGCGCCGGTACCGAACAATTGACTTACCGACATC  
CTCCGGGACGCGCAAAATGCTGTTTCGACGGAACGTAATCCTCTTCGTCGCCGCTCTTTTCGCTCTCACGATTCCGTGTGGTTCGCGCGA  
CGGCCGCTCATCAGGACCAGACAGTCTCAATGTCTGGTACCGGCACAATGGTGACACTGCGGCAACTGAGTAGGTCTGGTCACTCTG  
GTGCACCGTCGCTTACGCTGACCTTCGGGATACTGTCTGCAGACATCTGGAGCGCCTGTCTTCCCTAGTATAAATGATGTCTGTCC  
GCAGGTCCTTGAAGACCGCTCGAGTCCCACTTGAGTTTTAGGTAGGACCTGTTCTCCACAACCCCTCTTTC

**Figure 9 : Séquence nucléotidique du vecteur pELP (suite),  
contenant le promoteur du gène laccase (4457-6983), un  
marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le  
terminateur du gène sc3 (71-507)**



**Figure 10 : Résultats de production des transformants présentant les activités les plus importantes. La culture a été effectuée avec ou sans (témoin) éthanol**



**Figure 11 : Suivi des activités laccase des transformants GPD 14 et 12.7 en fonction du temps avec ou (témoin) sans éthanol**

TTGGAGATGGTTCTATATATCAAAATGATCTTCTGTCTGAGCTTTCCTCGTCTTGTGTTTCTGCTTGTACGTGCCCGGCACATGCTTTTATTAAACCAT 100

TGGCGAGCTGCCCGCGCCCAAGSAGATAGCATAATCGCTGAGAAACCTAGTCTGCTCTATGCGCGTGTAAACGTTCTTGGCACTTATTITGCACTTCTC 200

TCAGAAATATAAGGCCATTGTGATACGGTTTCATCTAACCCACGGCTCCCTCGAAGATAGGGCTGCTCTCACTCTTCGCATTCTTACTGCTTTAAA 300

CTCAGTTCACTGCCGCTGTGGGTCCCGTTACGGACTTAACACTGATCGTAGATACTGTGCCCCCGACGGGTGCTGTTTCCGCGCGGGAAGGTTAGACTT 400

SVVBAAVGVPTDLTLTIVDTVA PDGGAFAARE 43

CGACTGTAAATGGCCGATTTGAGTTTCTAATTATANTCTTCCAGCCATTGTGCTCCAAGAGGAACCAAACCTCGCTATTGGTCCGGTCACTGTAGGTGGG 500

TAGCTACGAGTCTTCTCTCTTCACTTTAGTCTCATCACCAAGTGATATGATATTAAATAAGCTGCTAAGAGGGGCAACTTTCGGCTCAATGTATTCAACAAT 600

TTGGATTCTCGGAACATGCGCCAACTACTTCCATTCTTGGCATGGCATCTTCCAGGAAGAACGGTACGTGTGATATCGATATCTATCTGTATCTCAT 700

LDSPNMRQSTSIHWHGIFQGN 74

GACTCGAATATAGCTCAGAAATGGCTGGTGGCTTGGCCTTCTGAAGCCTGCTCGAATTTATCTTCTGAATTTTATAGATGCGCGCGCATTCGTAAAC 800

AGGTAAAGAGATGTTCTGCTTCTGTTCCCGAGAATTAATTACTAGTGGCCCTATGCCCGCGAGGGGACCTGCTTCTGTCAGCACTTTACCGAATCT 900

Q 125

TTCCAGACTGGCAGATTTTGGTATCATTCCTCCATTCTCACTCAATACTCGCGATGGACTGAGGCGAGCATCTGCTGCTTCTCTTCTTCATCAAGTCA 1000

FQTCGTFWYHSHLSTQYCDGLRGAFV 150

CCGCTTCTCTCACTTATCTAGATCTACGATCGCTCGACCTTACCGGTGCTCTACGATGTGACGACGAGTGTGATGTGATTTACTCTGGCGGACTG 1100

IYDPLDPLYRLLYDDESTVITLADW 176

GTAACACAGCTATGCGGAGGACATCTAATCGCTAGGAGATTTCCTCAAGATGTCTCTCTGCTCTCTGAAATCCATGAACTAGTGTAGGCGACACTA 1200

YHSYAEDILIA 191

TCCTCTCAATGGTCAACGGAATTCGCGGAGCGCGGGAACGGCAACGAACTATCTGTCTTACTGTTGAGCATGGAAGCGGTAGGCATCTCCCT 1300

ILINGHGRFAAGGTATELSVITVEHGRKR 220

CGGCTTTGTAGATGTGCTTAATTGTGATAGCTACCGATTGGCATTECCAATCTGCTTGTGACCTTGGTTTGGCGTGAATTCGATAGCCATCGAA 1400

YRLRFANIACDPWFVAVKIDSHTN 243

CCTTCGCGTTATCGAAGCTGACGGTATTACTACTGTGCTGTGACGGTGGACTCCTTCAATGTAGGCTTACCCTTAGCACTTTCCCACTCTGGATCTCT 1500

LRVIEADGIT 254

TATGACTTCCCAGATCTTTGTGGGCAACGATATAGTGTCTCTCTCCATGCCAACCAAGCTGTGTGAAACTACTGTAACTGCTCTAAATGTTGCATGAC 1600

ITFVGQRYSVILHANQPVGN 274

TGTCATGATTTCAACCGCCAGGATCTCGGCGCGCTCCGAACCGCGCTGAGCAATTTCGCGGGTGGGATCGACTCGGCTATTCTCCGTTATGTTGGCGC 1700

WIRAAAPNGVSNFAGGIDSAI LRVYGA 300

CCCAAGAGAAGAGCCCAACACTAGTGAGGATCTCCATCCGACACTCAAGAGCAGAGACTTTCACCGCTGATCTACCGCGCGCGCAGGACTCCAC 1800

PEEPNTSPSEDTPSLTQEQDLHPLILPLPGAPGIGH 333

TCCGCTGGGCGCGCGAGCTTGTCCACACGATCAATGGAGTTTGTAGAGTGTGGCGACTTTTCTGGCCCOCTTTATTAAATCAATCTGGTAGGATGCG 1900

SRGAADVHVHTVSMEE 348

GCAAACCTCCAATCTCTGGAATGCGCTGGCTTCCAGCCGTGGCTCATCTCTTCAAGAAATTTATCTAGCTGACGATTTGAAATGTAGCCCGAC 2000

L TILKCSPT 357

TGCGCGCTCTCTGCAAAATATTATCGGAGCGCGAGACTGCTAATACCTTCTCCGCGCGGATCCTTTATCCAAGCGTCGCACAAATGACATCGTGGAGCT 2100

MPVLVQLI LSGAQNTAL LPA GSEFIQASHNDIVAE 391

CAATTTCCAGCTGTCAACGAGGAGCTGTCGCTGGAGCGTGGCTCCATCTTCTTCCGACCTGAAATTTAGACGTCTTTAGACATCAATTCATCT 2200

NFPNAVNVAAVGGFE 409

GTGAGCGCAGCGGACCTTTGGCTTATGCGATATGACTTATTATTAGCATGGCCATGCACTTGACGTTATACGCTCTGCTGGAAACGAACTCCGATAACT 2300

HGHAFDVIRSAGTNSDN 426

GGTTCATCGGTATTTTCTTCACTTCCATTAAGATGAGCATGGCTCACTGGTTTTCACCACTGCGAGAGATCTGCTATCCACCGGTACCGATC 2400

WFNP 441

CTAATGACAACTGTACCTGTTTCTGATTTGATGTGCTGTTTGTATTTGACTGTGGAACGACCACTTCCGTCGCGGCGGACACCTGACGTAACTG 2500

PNDNV 455

CTGAATCTCTGCTTGTCTTGGTCTCATTAATCTCATCAGAGGTCCATGGTCTCTTCACTGCCCACTGACTGCGCACTGAACTCGGCTTGTGCTTGT 2600

G PWF LHC HLD WHLEL CGFALV 475

GATTGCAAGAGCGCTAGCGAATGGGACAGCGACATTAACCTCTCTGGTGGCTGCTGTGAACCTTTCTCCCTACACTTGTAAAGTCTGTAGCTG 2700

IAEAPSEWSDINFP 491

CGTGGGATGACTATGCCCTACGTTTCCGTTGGCTTCCTTTTACTATTCAAGTTTCTCACAATCTCACAGATATGATGCCCTGCGCGCTGAG 2800

AWDDLCPTFAFWLFLFYF FKFPHILNFTDMMPCLRSL 525

CAGCAGTAATCGAGTTAAAGACCTCAAGCTGTGATTAAGGAAAAAGCAAGCAAGAAATGAACTCTGATTTATCTTATCGACAGATCTCAATTCAA 2900

S SNRVKNLVDA 536

CCTACGGATTTTCTCTGCACTTGAATTCGGTGTAGATCCCATCTCTGGTGGAGTAGGAAAGAAATTTCTTGTATAAACCCATGCGTCTTCTACC 3000

AAATAATAAAGTCCGCTGGGCTAGTTAATCGT 3037

Gène de la laccase d'*Halocyphina villosa*

Figure 12

- 1 -

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

&lt;120&gt; PROCEDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE DETERMINEE PAR DES SOUCHES MONOCARYOTIQUES DE P. CINNABARINUS

&lt;130&gt; WOB 03 DH INR ORUS

&lt;160&gt; 16

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3331

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Pycnopus cinnabarinus

&lt;400&gt; 1

ctgcagacat ctggagcgcc tgtctttccc ctagtataaaa tgatgtctgt ccgcaggtcc	60
ttgaagaccg ctcgagttccc acttgagttt taggtaggac ctgtccacca aaccctctct	120
tctgatcatg tcgaggttcc agtccctctt cttcttcgtc ctggtctccc tcaccgtgt	180
ggccaacgca gccatagggc ctgtggcgga cctgaccctt accaatgccc aggtcagccc	240
cgatggcttc gctcgcgagg ccgtcgtggt gaacgggtatc acccctgccc ctctcatcac	300
aggcaataag gtatgtatat gctgctcgtc cctcagagct acatacatct gatccacaat	360
cgtttagggc gatcgattcc agtcaatgt catcgaccag ttgacaaatc ataccatgtt	420
gaaaacatct agtattgtaa gggttcagtt tttcccgcact accatgttat tgaccatcac	480
cactcgtagc attggcacgg cttcttccag caaggcacga actgggcccga tgggtcccgcg	540
ttcgtgaacc agtgtcccat cgcttcgggc cactcgttct tgtatgactt tcaagttccc	600
gaccaagcag gtacgaattc cgtacacgtt tcattgcgtc gcaactaac ctctcttac	660
tagggacttt ctggtaccat agccatctct ccacgcaata ctgcgatggt ttgagggggc	720
ctttcgtcgt ctacgacccc aacgatcctc acgctagcct gtatgacatt gataacggtg	780
agcagatcat ggtatcgcaa tattgcgtcc acttatgctt cctggcatcc agacgacact	840
gtcattacgc tggctgattg gtatcacgtt gctgccaaag tcggacctcg cttcccgtac	900
gtgtcaaagt tctacgagag atctcacata tacgactaga ctcacttcgc tgattacaga	960
tttggctccg attcaaccct tatcaatgga cttgggtcgaa ccactggcat agcaccgtcc	1020
gacttggcag ttatcaaggt cagcgagggc aagcggtgaa tatggatggt catcactgca	1080
cattggctct gatacatggc cttgtttcca cagctaccgc ttccgcttgg tgcgctttc	1140
ttgcgatccg aaccatacat tcagcattga taatcacaca atgactataa ttgaggcgga	1200
ctcgatcaac actcaacccc tagaggttga ttcaatccag atttttgccg cgcagcgcta	1260
ctccttcgtg gtaggtcgta ggctcctgtc atcaagtttg cagacattct tagatacacc	1320
tttttcaatg cagctggatg ctagccagcc ggtggataac tactggatcc gcgcaaacc	1380

- 2 -

tgccttcgga aacacagggtt ttgctggtgg aatcaattct gccatcctgc gttatgatgg	1440
cgcacccgag atcgagccta cgtctgtcca gactactcct acgaagcctc tgaacgaggt	1500
cgacttgcat cctctctcgc ctatgcctgt ggtacgtgtc tcaaagaacc tcgatcacta	1560
agtgcattgt aactcatatg gtgcatgaca gcctggcagc cccgagcccg gaggtgtcga	1620
caagcctctg aacttgggtct tcaacttcgt gagtactggc gcgcttcctg agcacacgtt	1680
cgaacaaagc ctgataccat gcagaacggc accaacttct tcatcaacga ccacaccttt	1740
gtcccgccgt ctgtcccagt cttgctacaa atcctcagtg gggcgagggc ggctcaggac	1800
ctggtcccgaggggcaggcgt gttcgtttctt cccagcaact cgtccattga gatattcttc	1860
cctgccactg ccaatgcccc tggattcccc catcggttcc acttgcacgg tgtacgtctg	1920
ccttccccctc gtctaaaggc ggagtcgata totgactccc atcacagcac gccttcgctg	1980
tcgtccggag cgcgggggagc agcgtctaca actacgacaa cccgatcttc cgcgacgtcg	2040
tcagcaccgg ccagcccggc gacaacgtca cgattcgctt cgagaccaat aaccaggcc	2100
cgtggttcct ccaactgccac attgacttcc acctcgacgc aggttttgct gtagtcatgg	2160
ccgaggacac tccggacacc aaggccgcga acctgttcc tcaggcgtgg tcggacttgt	2220
gccccatcta tgatgcactt gaccccgagc acctctgagc gggattgtta ctgtgacctg	2280
gtgtgggggg aacatgtcga gggctttcat cgatcaggga ctttcaagggt tggcataata	2340
tacctcacgg cctggatgac tcggacagcg tgtgggcgtg ggtgtaactc tgcttgatgt	2400
tgaaaaaagg attttatgta gaacaattta tgagcaatca gcaatcaata ggattgtgtc	2460
ggtttcgacg aaatgtcttg tctccctgac attacttttg gtgcgagaaa tgggtccatg	2520
atacacatca ttgagctctc aataccaaga aggattacc atgtcaatac ccaagatcat	2580
gtcttcgctg tccgcaatgg tctcatgttg cgttgagcag atcgagtagc gttgaaaagc	2640
gattagtatt acatgcaaca tgcaacattt ggaagggggc atgcagaggt tcagctcgcg	2700
tcagtcggcc aagtagcgac ctttgccgca ctgcctgtta acctgaacgt atgcttcaga	2760
actccgtcgg tatcgagagc gatcgtgtac gttccgggat agatccattg atccccgctc	2820
tggtcggcgc gtgcgatggc cccgagcgtc accggcagct tcgcgatcgc gcttttccta	2880
ggggcgaggc cgtgtacccg cgtgtacgag acgagctgct tgttcgggtg gggcgaaggc	2940
ccgaaggagc cactcacgaa gagcaatgcg acgtaatccg aggtagcctt gcccggttta	3000
gtcacacgca cggagaacgt gtcgagcggc gcgaggtcga ggaaggcggc gctcttctga	3060
ccgcgctgta cgaggtcgga aatcgaatac gtcgatggcg gtctccaaa gtccgtgacg	3120
ttggctcgc atcgcccgccg gcctggagct gcccaagaga aatcgaagggt ggtgaagtgc	3180
agtccaaagc caaatctgta gaccggcgtg ccggtgtacc acttgatatg acgccccggg	3240
ttcgacgcgc ttgggcgaag ggtcatgtca gtcacgggaa cctgatcagc gtagatggct	3300
gggtattggg tgatgggcag gcgtcctgca g	3331

- 3 -

<210> 2  
 <211> 518  
 <212> PRT  
 <213> Pycnopus cinnabarinus

<400> 2

Met Ser Arg Phe Gln Ser Leu Phe Phe Phe Val Leu Val Ser Leu Thr  
 1 5 10 15

Ala Val Ala Asn Ala Ala Ile Gly Pro Val Ala Asp Leu Thr Leu Thr  
 20 25 30

Asn Ala Gln Val Ser Pro Asp Gly Phe Ala Arg Glu Ala Val Val Val  
 35 40 45

Asn Gly Ile Thr Pro Ala Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys Gly Asp Arg  
 50 55 60

Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Gln Leu Thr Asn His Thr Met Leu Lys  
 65 70 75 80

Thr Ser Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe Gln Gln Gly Thr Asn Trp  
 85 90 95

Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys Pro Ile Ala Ser Gly His  
 100 105 110

Ser Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp Gln Ala Gly Thr Phe Trp  
 115 120 125

Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro  
 130 135 140

Phe Val Val Tyr Asp Pro Asn Asp Pro His Ala Ser Leu Tyr Asp Ile  
 145 150 155 160

Asp Asn Asp Asp Thr Val Ile Thr Leu Ala Asp Trp Tyr His Val Ala  
 165 170 175

Ala Lys Leu Gly Pro Arg Phe Pro Phe Gly Ser Asp Ser Thr Leu Ile  
 180 185 190

Asn Gly Leu Gly Arg Thr Thr Gly Ile Ala Pro Ser Asp Leu Ala Val  
 195 200 205

Ile Lys Val Thr Gln Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Leu  
 210 215 220

- 4 -

Ser Cys Asp Pro Asn His Thr Phe Ser Ile Asp Asn His Thr Met Thr  
 225 230 235 240

Ile Ile Glu Ala Asp Ser Ile Asn Thr Gln Pro Leu Glu Val Asp Ser  
 245 250 255

Ile Gln Ile Phe Ala Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val Leu Asp Ala Ser  
 260 265 270

Gln Pro Val Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Asn Pro Ala Phe Gly Asn  
 275 280 285

Thr Gly Phe Ala Gly Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Asp Gly  
 290 295 300

Ala Pro Glu Ile Glu Pro Thr Ser Val Gln Thr Thr Pro Thr Lys Pro  
 305 310 315 320

Leu Asn Glu Val Asp Leu His Pro Leu Ser Pro Met Pro Val Pro Gly  
 325 330 335

Ser Pro Glu Pro Gly Gly Val Asp Lys Pro Leu Asn Leu Val Phe Asn  
 340 345 350

Phe Asn Gly Thr Asn Phe Phe Ile Asn Asp His Thr Phe Val Pro Pro  
 355 360 365

Ser Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln Ala Ala Gln  
 370 375 380

Asp Leu Val Pro Glu Gly Ser Val Phe Val Leu Pro Ser Asn Ser Ser  
 385 390 395 400

Ile Glu Ile Ser Phe Pro Ala Thr Ala Asn Ala Pro Gly Phe Pro His  
 405 410 415

Pro Phe His Leu His Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly  
 420 425 430

Ser Ser Val Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser  
 435 440 445

Thr Gly Gln Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Glu Thr Asn Asn  
 450 455 460

Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Asp Ala  
 465 470 475 480

Gly Phe Ala Val Val Met Ala Glu Asp Thr Pro Asp Thr Lys Ala Ala

485

- 5 -  
490

495

Asn Pro Val Pro Gln Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Ile Tyr Asp Ala  
500 505 510

Leu Asp Pro Ser Asp Leu  
515

<210> 3  
<211> 2527  
<212> ADN  
<213> *Pycnopus cinnabarinus*

<400> 3  
agatctccga accagaaatg cgattgcgtt caggcccaat taagaataaa gctgcgtcag 60  
ggcagcgacg tatcttgatc catcattgac tcaccggcat cggcgtcaac accaaagcaa 120  
gctcgtccca cccataggcg tgcaccggcc ggcgtgcgcc attgaggtac atgagcgggg 180  
cgaaagtccg ccattggtag ccctgtcgtg gacgcgcggc gatgaaacgt ttcccaccat 240  
tggaagaaa cgtctgcggc ccatcatccc ttcaccggat gacaaggcgg cgtcgcgcct 300  
ttgcgcgaga ggccggcggg cgacatgcac agcgaaggct cgttgccgat gggaagcagg 360  
caatcagtgg gtgtcctacg cgcaccgat ggtcggggag cgtaggcgcc ctcccataag 420  
ggggcaagca tcatgatgct ctccgattcg ggaagcctgg tgcgatgctg gagagactct 480  
ctccgagaga ccagtgtgcy caacgttcct ggctggaag actttaaggt gagtgtagaa 540  
gggcgagcag aggacgatca tcggattgca ggaaccatcg gcatcctcag cctgggaagg 600  
atggctcttg gtagacattc gcggaagggt tcctagatgt gagcgggctt cttggatgat 660  
catgtogtaa ctttttctga cctcgtcggg ggtacgcatg gcaggattga gcattacggg 720  
atgcctocca ttcataaacg ataaccctt ccttcagggt ggtcatctcc atagagcggc 780  
acgtcttcaa ggccataggct attcacacct ccttcgcaac atccctattc acgggtgtctg 840  
taaggaacga cttgtcatgg gatcacatga agtgcagcat actgttcgcc ggtctcgcag 900  
tacagacgct agtacgggaa gtcgacatcc aagcgttcag tcaccacatg gcaaaaaagc 960  
tgcaccatac tctttatggg gagttgttcg tgagtggat acagtcattc atgagggaat 1020  
gcccaccgga tagggtgtgg cgcccgcaat attcatcgcc tggcaatagt cgatgtgcgt 1080  
ccttggtcaa tgaatatcat gggtcacatg tggagacggg taaacagcgt tgactgtgaa 1140  
tccctgggtg gtgttgggac gaacaggtag gttgcaggaa caccaatatc tcttcggcag 1200  
cccagttctt tgcgagcggc acaggcaggc atcgcgcaac agatcccagc catccggcct 1260  
ctgacattcg ggatacctga agcccttcag gtacggagcg aagagggtgg ctctctgcag 1320  
cgattggcgg acggatagct gtatttcctc tctcaccatt gggaagatgt gaaaggctcc 1380  
atcatatagc ggctcaactc tacctcgaat gtccaaacac ggcgggaata cttatttatg 1440

- 6 -

tggaacaaggc	cgagctatga	tagcttgctc	ccgaagttgg	taagtcccgc	aatctgcggt	1500
tcaggcaaca	gtctcggaaa	aataagaaga	atattgtagg	tgctgtagg	cgtatcgccc	1560
aatgcgcac	acacggaggc	tttaggagat	gaagcgccc	tgagcggtaa	gggagttggt	1620
tcaccgccc	cccgaccgac	tctctctctt	tcccagcatc	atgtctcggc	gcaaacttta	1680
ccctctattg	accaactcca	cgagaaagca	ggaacagctt	ccttgctctc	catgacgtcc	1740
gcaatccaga	cccttagccg	gttcgttact	catcgttatc	cctgccgcca	tggtagtggg	1800
gtcagcctgg	ccagtgcgta	gtcccgtctc	tcttgctgca	ctagagaagc	cccatgagac	1860
agcgtttttt	gctttatttc	tgctgtttct	atagacacca	taggggcaaa	cgatcctgca	1920
cgcccagagg	tattgggctc	gtcagattcc	cagtttttct	cctcggtctg	aatcggctgc	1980
acggcagata	aatcgccgg	aaatgctata	gcccttcata	gcccgctatg	agagtcgcaa	2040
aaggcttgtc	agtcaggctg	gtcagtggtc	tctcacgaag	agcgtcaact	tcgcgcgaca	2100
gccgcctttc	agggcaagat	agatcctccc	atcatccctt	actgcgtcca	gcgccggtac	2160
cgaacaattg	acttacccgac	atcctccggg	acgcgcaaat	gctgttcgac	ggaacgtaat	2220
cctcttcgtc	ccgcctcttt	tcgctctcac	gcattccgtg	tggttcgcgc	gacggccgct	2280
catcaggacc	agaccagtct	caatgtctgg	taccggcaca	atggtgacac	tgccggcaact	2340
gagtaggtct	ggtcactctg	gtgcaccgtc	gcttaagctg	accttcggga	tactgtcctg	2400
cagacatctg	gagcgccgtg	ctttccctta	gtataaatga	tgtctgtccg	caggtccttg	2460
aagaccgctc	gagtcccact	tgagtttttag	gtaggacctg	tcaccaaacc	ccctctttct	2520
gatcatg						2527

<210> 4  
 <211> 643  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Séquence promotrice du vecteur pEGT

<400> 4	
cgaccgagcg	cgcgccaccc agcctatccc gcgcgggtcg ggacccaaaa taagcgggcc 60
ccgccgcgcc	ccgtcggggc agcgggtgta tctacgaacg gaactgggag gcgactcgga 120
agagtttggg	tagaaagggg aacaccatcg cggacggccc agtgcctctgg dcagctgagc 180
gtgcattgtg	ttcaattctg acctgtggca tgtaagggaac gtgctcggga tcggaggggtg 240
gcgcgagagc	ctcttcgggtg tgagattagt aactgtactg cgaagccgcg gagggggttag 300
gatgagaggt	agacagggtc gcagcccagg tgcgagaagg actgcgaagg actgttcttc 360
gaccgcgcac	ctgcaattgc gcgcatggat agaatagagc gtcgccctcg aggggggactc 420
gaccaggggt	ggtggtggcg cccgacggga ctggctggggc atttgacagat ggcgcgcagt 480
ccaggccgcc	gccgatgtgt tcatcccgtt ttgtcagtat cgatcggatc ttccggggcgt 540

- 7 -

gggtataaaa gcgcgcccgc cgccgtctcc ctctttctcc agcactccca tccagagcac 600  
 ttccctctcc catcgcatcc catcacacaa taatgcccac cac 643

<210> 5  
 <211> 1033  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Séquence promotrice du vecteur pESC

<400> 5  
 agcttctccg gccccgaatc gaacggcagg atgtgtgggc gtgtccaata ttgccatgaa 60  
 aatctgtcag aagtgagccc tctcgtcacc ctgtacagct tcgctgagtt gaaaagcagg 120  
 gttcatcttg ggctcactga tgcactgagc tcgaccggag aactaaatga ccagccggag 180  
 tgttcactaa cttaacgccg ggtattcagg gcagcttctc tatgttgcg ctagcacgta 240  
 gatcaccgcc catgaacggg ggaacgggg aggggtgcgt ttggtacgtc ttacgtctg 300  
 gctatgttgt attgaccagc gtctgcagaa gatgggcacg acgatgcgcc gagccggcca 360  
 gtgtcgtcgg atgtccactg ttgaggccat ctttttgcta gacagacgga agagctttgg 420  
 aggtgcgatt cctctacgaa tgggaagggg cttagatgga gagtgacacg tctgagctcc 480  
 ccaacacgcc ttgcgcgagg gtgcgtctcc gcggacattc acctcagttc attgttctga 540  
 cctgcctaatt tgtatagacc ggccaacaac cttgctgacg cccatcataa cagtgccctg 600  
 cacagagcct tcccactcag tcggcgccct cctcaatcaa tcccactaac tcgccggctc 660  
 tgcccccttg ccgctcgaca cgctcgttgg aagagcccg gcacggggcg ccgctcccc 720  
 cttccctccg cgctcgtcatg cagcgagcgt taatgttgct gcaggcgagc cgtaagtata 780  
 ttcaaaggcg tagcgaatga atagcaggcg cgcggggacc tggcacgcgc ggcataaaca 840  
 tgcagacttg ggtgacgata acttgaactc agacgcggcg aatgaatatc caaacgcgcg 900  
 ggaagaaaat aatttacggg agcctcccca ggtataaaag cccctcacc gctcactctt 960  
 tctccagtcg aacaccccag ttcaactacc cagcccttcc ttccttcgct atccttcytc 1020  
 acaacctgct cgc 1033

<210> 6  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Amorce PCR

<400> 6  
 caytggcayg grttcttcc 19

<210> 7

- 8 -

<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Amorce PCR

<400> 7  
gagrtggaag tcratgtgrc

20

<210> 8  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Amorce PCR

<400> 8  
ggataactac tggatccgcg

20

<210> 9  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Amorce PCR

<400> 9  
cgcagtattg cgtggagag

19

<210> 10  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Amorce PCR

<400> 10  
gacatctgga gcgcctgtc

19

<210> 11  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Amorce PCR

<400> 11  
atcgaaggtt ccgatgactg acatgac

27

<210> 12  
<211> 5122  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>

- 9 -

## &lt;223&gt; Séquence du vecteur pEGT

&lt;400&gt; 12

catgggatat cgcattgcctg cagagctcta gagtcgacgg gcccggtacc gcggccgcct	60
taagacgcgt ggatccgcag gtgaacgcgc ctatcgggtg gatattcggg cgacgggagc	120
ctcggcaatc tgagcctcgt tactgcctag caaattcgga atcccttcga tgtcataggg	180
tcgcggaaca gtgatcgtct tgctacatac tccaaggtgt tgactcattc cctcgataat	240
gaacattgtt gttgttggtt gttctctatc cgctcagtc cgcgaccca cactgcatg	300
gttgaacttc gccacgcaac aaccgcatga cgacatggcg aacctaaagta aaggctgagt	360
cgtggactaa agcactccac ttacggcgga ggatgccagt ctacgtcatg aatgaagcct	420
caggccccga agtaaggggg tacaaaagga gggtgaaagg tggacgtttt cttaccatcc	480
ttcacctcc cagaccacca tgccgggaat tcccagcttg ctcaaaaagg ttctgcccgt	540
acgcccgcga aattccttcg aggtggcccc tatcgcatc atgcacgact tcaaacatc	600
cattctatca ttttgggac gtacaattat tagacatgtt gtacaacgtt acattccttt	660
cttcttttac tctccggccc agtctatgta gaggtaaagt acaagcgtcc aaaggatcag	720
gcacttagag cgcgcgtct tgcttcgcg cttagagcgc gccgtcctgc ttccgcgcgt	780
agacgagcag gtgcgagaca cggcgggagt agccccactc gttgtcgtac caggcaatga	840
gcttcacgaa gctcttgctg atcgcgatgc cggggatcga tccacgcgtc ttaaggcggc	900
cgcggtaccc cctcggaacc gtccggcgcg gtccgaccgg cgggtgttgg cggcgtcgg	960
cagtcctgct cctcgccac gaagtgcac cagttgcgg ccgggtcgcg cagggcgaac	1020
tcccgcccc acggtgctc gccgatctcg gtcattggcg gcccgaggc gtcccggaag	1080
ttcgtggaca cgacctccga ccaactcgcg tacagctcgt ccaggccgcg caccacacc	1140
caggccaggg tgttgtccgg caccacctgg tccggaccg cgctgatgaa cagggtcacg	1200
tcgtcccga ccacaccggc gaagtgcgtc tccacgaagt cccgggagaa cccgagccgg	1260
tcggtccaga actcgaccgc tccggcgacg tcgcgcgcgg tgagcaccgg aacggcactg	1320
gtcaacttgg ccatgcatgg tgatgggcat tatgtgtgat gggatgcgat gggagagggg	1380
agtgtcttgg atgggagtgc tggagaaaga gggagacggc gggcggcgcg ccttttatac	1440
ccacgcccga aagatccgat cgatactgac aaaacgggat gaacacatcg gcggcgccct	1500
ggactgcgcg ccatctgcaa atgcccagc agtcccgtcg ggcgccacca ccagccctgg	1560
tcgagtcctc ctcgagggcg acgctctatt ctatccatgc gcgcaattgc aggtgcgcgg	1620
tcgaagaaca gtccttcgca gtccttctcg cacctgggct gcgaccctgt ctacctctca	1680
tcctaacccc tccgcggctt cgcagtacag ttactaatct cacaccgaag aggtctctcg	1740
gccaccctcc gatcccgagc acgttcctta catgccacag cgtcagaatt gaacacaatg	1800
cacgtcarat cagatccccg ggaattcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa	1860

- 10 -

ttgttatccg	ctcacaatc	cacacaacat	acgagccgga	agcataaagt	gtaaagcctg	1920
gggtgcctaa	tgagtgaagt	aactcacatt	aattgcgttg	cgctcactgc	ccgctttcca	1980
gtcgggaaac	ctgtcgtgcc	agctgcatta	atgaatcggc	caacgcgcgg	ggagaggcgg	2040
tttgcgatt	gggcgctctt	ccgcttcctc	gctcactgac	tcgctgcgct	cggtcgctcg	2100
gctgcggcga	gcggtatcag	ctcactcaaa	ggcggttaata	cggttatcca	cagaatcagg	2160
ggataacgca	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	2220
ggccgcgttg	ctggcggttt	tccataggct	ccgccccct	gacgagcatc	acaaaaatcg	2280
acgctcaagt	cagagggtggc	gaaacccgac	aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	2340
tggaaagctcc	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	gacctgcgc	cttaccggat	acctgtccgc	2400
ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgctttc	tcatagctca	cgctgtagg	atctcagttc	2460
ggtgtaggtc	gttcgctcca	agctgggctg	tgtgcacgaa	cccccggtc	agcccgaccg	2520
ctgcgcctta	tccggttaact	atcgtcttga	gtccaaccgc	gtaagacaag	acttatcgcc	2580
actggcagca	gccactggta	acaggattag	cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	2640
gttcttgaag	tgggtggccta	actacggcta	cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcgc	2700
tctgctgaag	ccagttacct	tcggaaaaag	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaaac	2760
caccgctggg	agcggtggtt	tttttgtttg	caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	2820
atctcaagaa	gaccccttga	tcttttctac	ggggtctgac	gctcagtgga	acgaaaactc	2880
acgttaaggg	attttggtca	tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tccttttaaa	2940
ttaaaaaatga	agttttaaat	caatctaaag	tatatatgag	taaacttggt	ctgacagtta	3000
ccaatgctta	atcagtgagg	cacctatctc	agcgatctgt	ctatttcggt	catccatagt	3060
tgctgactc	cccgtcgtgt	agataactac	gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	3120
tgctgcaatg	ataccgcgag	acccacgctc	accggctcca	gatttatcag	caataaacca	3180
gccagccgga	agggccgagc	gcagaagtgg	tcctgcaact	ttatccgcct	ccatccagtc	3240
tattaattgt	tgccgggaag	ctagagtaag	tagttcgcca	gttaatagtt	tgcgcaacgt	3300
tggtgccatt	gctacaggca	tcgtggtgtc	acgctcgtcg	tttggtatgg	cttcattcag	3360
ctccggttcc	caacgatcaa	ggcgagttac	atgatcccc	atgttggtga	aaaaagcgg	3420
tagctccttc	ggtcctccga	tcgttggtcag	aagtaagttg	gccgcagtg	tatcactcat	3480
ggttatggca	gcactgcata	attctcttac	tgtcatgcca	tcgtaagat	gcttttctgt	3540
gactgggtgag	tactcaacca	agtcattctg	agaatagtg	atgcggcgac	cgagttgctc	3600
ttgcccggcg	tcaatacggg	ataataccgc	gccacatagc	agaacttta	aagtgtcat	3660
cattggaaaa	cgttcttcgg	ggcgaaaact	ctcaaggatc	ttaccgctgt	tgagatccag	3720
ttcgatgtaa	cccactcgtg	cacccaactg	atcttcagca	tcttttactt	tcaccagcgt	3780
ttctgggtga	gcaaaaaacag	gaaggcaaaa	tgccgcaaaa	aagggaataa	gggcgacacg	3840

- 11 -

```

gaaatgttga atactcatat tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcaggggta 3900
ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc 3960
gcgacacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt 4020
aacctataaaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg 4080
tgaaaacctc tgacacatgc agctcccgga gacgggcaca gcttgtctgt aagcggatgc 4140
cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgctc agcgggtgtt ggcgggtgtc ggggctggct 4200
taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggg gtgaaatacc 4260
gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgccat tcgccattca ggctgcgcaa 4320
ctgttgggaa gggcgatcgg tgccgggctc ttcgtatta cgccagctgg cgaaaggggg 4380
atgtgtctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tccagtcac gacgttgtaa 4440
aacgacggcc agtgccaagc ttgcatgcct gcaggtcgac gaccgagcgc gcgccacca 4500
gcctatcccg cgcgggtcgg gacccaaaat aagcggggcc cgccgcgcc cgtcggggcg 4560
gcgggtgtat ctacgaacgg aactgggagg cgactcgaa gagtttggtt agaaagggga 4620
acaccatcgc ggacggccca gtgctctggd cagctgagcg tgcatttgtt tcaattctga 4680
cctgtggcat gtaaggaacg tgctcgggat cggagggtgg cgcgagagcc tcttcggtgt 4740
gagattagta actgtactgc gaagccgcgg aggggttagg atgagaggta gacagggtcg 4800
cagcccaggt gcgagaagga ctgcgaagga ctgttcttcg accgcgcacc tgcaattgcg 4860
cgcatggata gaatagagcg tcgccctcga gggggactcg accagggctg gtgggtggcg 4920
ccgacgggac tggctgggca tttgcagatg gcgcgcagtc caggccgccg ccgatgtgtt 4980
catcccgttt tgtcagtatc gatcggatct ttcgggcgtg ggtataaaag cgcgccgccc 5040
gccgtctccc tctttctcca gactcccat ccagagcact tccctctccc atcgcatccc 5100
atcacacaat aatgcccatc ac 5122

```

<210> 13  
<211> 5490  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Séquence du vecteur pESC

```

<400> 13
agcttctccg gccccgaatc gaacggcagg atgtgtgggc gtgtccaata ttgcatgaa 60
aatctgtcag aagtgaagcc tctcgtcacc ctgtacagct tcgctgagtt gaaaagcagg 120
gttcatcttg ggctcactga tgactgagc tcgaccggag aactaaatga ccagccggag 180
tgttcactaa cttaacgcgg ggtattcagg gcagcttctc tatgttgccg ctacgacgta 240
gatcaccgcc catgaacggg ggaaacgggg aggggtgcgt ttggtacgct ttacgtctg 300

```

- 12 -

gctatgttgt attgaccagc gtctgcagaa gatgggcacg acgatgcgcc gagccggcca	360
gtgtcgtcgg atgtccactg ttgaggccat ccttttgcta gacagacgga agagctttgg	420
aggtgcgatt cctctacgaa tgggaagggg cttagatgga gagtgcacg tctgagctcc	480
ccaacacgcc ttgcgcgagg gtgcgtctcc gcggacatc acctcagttc attgttctga	540
cctgcctaatt tgtatagacc ggccaacaac cttgctgacg cccatcataa cagtgccttg	600
cacagagcct tcccactcag tggcgccctc cctcaatcaa tcccactaac tcgcccggctc	660
tgccccttcg ccgctcgaca cgtcgcttgg aagagcccg gcacgggctt ccgctccccc	720
cttccctccg cgctcgcatg caccgcagcgt taatgttget gcaggcgagc cgtaagtata	780
ttcaaaggcg tagcgaatga atagcaggcg cgcggggacc tggcacgcgc ggcataaaca	840
tgcagacttg ggtgacgata acttgaactc agacgcggcg aatgaatatc caaacgcgcg	900
ggaagaaaat aatttacggg agcctcccca ggtataaaag cccctcacc gctcactctt	960
tctccagtcg aacaccccag ttcaactacc cagcccttcc ttcttctgct atccttcytt	1020
acaacctgct cgccatggga tatcgcatgc ctgcagagct ctagagtcga cgggcccggg	1080
accgcggccg ccttaagacg cgtggatccg caggtgaacg cgcctatcgg tgggatattc	1140
gggcgacggg agcctcggca atctgagcct cgttactgcc tagcaaattc ggaatccctt	1200
cgatgtcata gggtcgcgga caagtgatcg tcttgctaca tactccaagg tgttgactca	1260
ttccctcgat aatgaacatt gttgttgttg tttgttctct atccgctcag tcacgcgacc	1320
ccacacgtgc atggttgaac ttgcgccagc aacaaccgca tgacgacatg gcgaacctaa	1380
gtaaaggctg agtcgtggac taaagcactc cactttacgg cgaggatgcc agtctacgtc	1440
atgaatgaag cctcaggtcc cgaagtaagg gggtaaaaa ggagggtgaa aggtggacgt	1500
tttcttacca tcttccacc tcccagacca ccatgccggg aattcccagc ttgctcaaaa	1560
aggttctgcc cgtacgcccg cgaaattcct tcgaggtggc ccctatcgca tacatgcacg	1620
acttcaaaac atccattcta tcattttggg atcgtacaat tattagacat gttgtacaac	1680
gttacattcc tttcttcttt tactctccgg cccagtctat gtagaggtaa agtacaagcg	1740
tccaaaggat caggcactta gagcgcgccg tcttgcttcg ccgcttagag cgcgccgtcc	1800
tgtctcgccg cgtagacgag caggctcgag acacggcggg agtagcccca ctggttgctg	1860
taccaggcaa tgagcttcac gaagctcttg ctgatcgca tgccggggat cgatccacgc	1920
gtcttaaggc ggccgcggta cccctcggga cccgtcgggc cgcgtcggac cggcgggtgt	1980
ggtcggcgct ggtcagtcct gtcctcggc cacgaagtgc acgcagttgc cggccgggtc	2040
gcgcagggcg aactcccgc cccacggctg ctgcgccatc tcggtcatgg ccggcccggga	2100
ggcgctccgg aagttcgttg acacgacctc cgaccactcg gcgtacagct cgtccaggcc	2160
gcgcacccac acccaggcca ggggtgtgtc cggcaccacc tggctcctgga ccgcgctgat	2220
gaacagggtc acgtcgtccc ggaccacacc ggcgaagtcg tcctccacga agtcccggga	2280

- 13 -

gaacccgagc	cggtcgggtcc	agaactcgac	cgctccggcg	acgtcgcgcg	cggtgagcac	2340
cggaacggca	ctgggtcaact	tggccatgca	tgggtgatggg	cattatgtgt	gatgggatgc	2400
gatgggagag	ggaagtgtc	tggatgggag	tgctggagaa	agagggagac	ggcgggcggc	2460
gcgcctttta	tacccacgcc	cgaaagatcc	gatcgatact	gacaaaacgg	gatgaacaca	2520
tgggcggcgg	cctggactgc	gcgccatctg	caaatgccca	gccagtcccg	tggggcgcca	2580
ccaccagccc	tggtcgagtc	cccctcgagg	gcgacgctct	attctatcca	tgcgcgcaat	2640
tgcaggtgcg	cggtcgaaga	acagtccttc	gcagtccttc	tgcacactgg	gctgcgaccc	2700
tgtctacctc	tcattcctaac	ccctccgcgg	cttcgcagta	cagttactaa	tctcacaccg	2760
aagaggctct	cgcgccaccc	tccgatcccg	agcacgttcc	ttacatgccca	cagcgtcaga	2820
attgaacaca	atgcacgtca	ratcagatcc	ccgggaattc	gtaatcatgg	tcatagctgt	2880
ttcctgtgtg	aaattgttat	ccgctcacia	ttccacacia	catacgagcc	ggaagcataa	2940
agtgtaaagc	ctgggggtgcc	taatgagtga	gctaactcac	attaattgcg	ttgcgctcac	3000
tgcccgcctt	ccagtcggga	aacctgtcgt	gccagctgca	ttaatgaatc	ggccaacgcg	3060
cggggagagg	cggtttgcgt	attgggcgct	cttcgccttc	ctcgctcact	gactcgctgc	3120
gctcggtcgt	tcggctgcgg	cgagcgggat	cagctcactc	aaaggcggta	atacggttat	3180
ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaga	acatgtgagc	aaaaggccag	caaaaggcca	3240
ggaaccgtaa	aaaggccgcg	ttgctggcgt	ttttccatag	gctccgcccc	cctgacgagc	3300
atcacaaaaa	tcgacgtcca	agtcagaggt	ggcgaaaacc	gacaggacta	taaagatacc	3360
aggcgtttcc	ccctggaagc	tccctcgtgc	gctctcctgt	tccgacctg	ccgcttaccg	3420
gatacctgtc	cgcttttctc	ccttcgggaa	gcgtggcgct	ttctcatagc	tcacgctgta	3480
ggtatctcag	ttcggtgtag	gtcgttogct	ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccg	3540
ttcagcccca	ccgctgcgcc	ttatccggta	actatcgtct	tgagtccaac	ccggttaagac	3600
acgacttata	gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	aggtatgtag	3660
gcgggtgtac	agagttcttg	aagtgggtggc	ctaactacgg	ctacactaga	aggacagtat	3720
ttggtatctg	cgctctgctg	aagccagtta	ccttcggaaa	aagagttggg	agctcttgat	3780
ccggcaaaaca	aaccaccgct	ggtagcgggtg	gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	3840
gcagaaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	tgatcttttc	tacgggggtct	gacgctcagt	3900
ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggattttgg	tcattgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	3960
agatcctttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaactt	4020
ggtctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	4080
gttcatccat	agttgcctga	ctccccgtcg	tgtagataac	tacgatacgg	gagggccttac	4140
catctggccc	cagtgcgtgca	atgataccgc	gagaccacag	ctcaccggct	ccagatttat	4200

- 14 -

cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg 4260  
 cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 4320  
 gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta 4380  
 tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt 4440  
 gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag 4500  
 tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa 4560  
 gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgctggc 4620  
 gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt 4680  
 taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc 4740  
 tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta 4800  
 ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa 4860  
 taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca 4920  
 tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac 4980  
 aaataggggt tccgcgcaca tttcccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta 5040  
 ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt ctcgcgcggt 5100  
 tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc 5160  
 tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt 5220  
 gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatatgc 5280  
 ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaataaccg catcaggcgc cattcgccat 5340  
 tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtgcggc ctcttcgcta ttacgccagc 5400  
 tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt 5460  
 cagcaggttg taaaacgacg gccagtgcca 5490

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 6983

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Séquence du vecteur pELP

&lt;400&gt; 14

catgggatat cgcattgctg cagagctcta gagtgcacgg gcccggtacc gcggccgcct 60  
 taagacgcgt ggatccgcag gtgaacgcgc ctatcggtgg gatattcggg cgacggggagc 120  
 ctcggaatc tgagcctcgt tactgcctag caaattcgga atcccttcga tgtcataggg 180  
 tcgcgacaa gtgatcgtct tgctacatac tccaagggtg tgactcattc cctcgataat 240  
 gaacattgtt gttgttgttt gttctctatc cgtcagtcga cgcgaccca cagtgcatg 300  
 gttgaacttc gccacgcaac aaccgcatga cgacatggcg aacctagta aaggctgagt 360

- 15 -

cgtggactaa agcactccac tttacggcga ggatgccagt ctacgtcatg aatgaagcct	420
caggtcccga agtaaggggg tacaaaagga gggtgaaagg tggacgtttt cttaccatcc	480
ttccacctcc cagaccacca tgccgggaat tcccagcttg ctcaaaaagg ttctgcccgt	540
acgcccgcga aattccttcg aggtggcccc tatcgcatc atgcacgact tcaaaacatc	600
cattctatca ttttgggatc gtacaattat tagacatgtt gtacaacgtt acattccttt	660
cttcttttac tctccggccc agtctatgta gaggtaaagt acaagcgccc aaaggatcag	720
gcacttagag cgcgcgctct tgcttcgcgc cttagagcgc gccgtcctgc ttccgcgcgt	780
agacgagcag gtcgcagaca cggcgggagt agccccactc gttgtcgtac caggcaatga	840
gcttcacgaa gctcttgctg atcgcgatgc cggggatcga tccacgcgtc ttaaggcggc	900
cgcggtaccc cctcggaccc gtcggggcgc gtcggaccgg cgggtgttggc cggcgtcggc	960
cagtctgtct cctcggccac gaagtgcacg cagttgcggc ccgggtcgcg cagggcgaac	1020
tcccgccccc acggtgctc gccgatctcg gtcattggcg gcccgaggc gtcccggaag	1080
ttcgtggaca cgacctccga ccactcggcg tacagctcgt ccaggccgcg caccacacc	1140
caggccaggg tggtgtccgg caccacctgg tcccgaccg cgtgatgaa cagggtcacg	1200
tcgtcccga ccacacggc gaagtcgtcc tccacgaagt cccgggagaa cccgagccgg	1260
tcgggtccaga actcgaccgc tccggcgacg tcgcgcgcgg tgagcaccgg aacggcactg	1320
gtcaacttgg ccatgcatgg tgatgggcat tatgtgtgat gggatgcat gggagagggg	1380
agtgtcttgg atgggagtg tggagaaaga gggagacggc gggcggcgcg ccttttatac	1440
ccacgcccga aagatccgat cgatactgac aaaacgggat gaacacatcg gcggcggcct	1500
ggactgcgcg ccatctgcaa atgcccagcc agtcccgctg ggcgccacca ccagccctgg	1560
tcgagtcccc ctcgagggcg acgctctatt ctatccatgc gcgcaattgc aggtgcgcgg	1620
tcgaagaaca gtccttcgca gtccttctcg caoctgggct gcgaccctgt ctacctctca	1680
tcctaacccc tccgcggctt cgcagtagag ttactaatct cacaccgaag aggtctctgc	1740
gccaccctcc gatcccgagc acgttcctta catgccacag cgtcagaatt gaacacaatg	1800
cacgtcarat cagatccccg ggaattcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa	1860
ttgttatccg ctcaacaatt cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg	1920
gggtgcctaa tgagtgaagt aactcacatt aattgcgttg cgtcactgc ccgctttcca	1980
gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatggc caacgcgcgg ggagagggcg	2040
tttgcgatatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg	2100
gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg	2160
ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa	2220
ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg	2280

- 16 -

acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc	2340
tggaagctcc ctcggtcgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc	2400
ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc	2460
ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa ccccccgttc agcccgaccg	2520
ctgcgccctta tccggtaact atcgctctga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc	2580
actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga	2640
gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc	2700
tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaaac	2760
caccgctggg agcgggtgggt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg	2820
atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc	2880
acgttaaggg attttggcca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa	2940
ttaaaaatga agtttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtta	3000
ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt	3060
tgctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag	3120
tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca	3180
gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tctgcaact ttatccgct ccatccagtc	3240
tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt	3300
tgttgccatt gctacaggca tcgtgggtgc acgctcgtcg tttggatatgg cttcattcag	3360
ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttggtgca aaaaagcggg	3420
tagctccttc ggtcctccga tcgttgctcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat	3480
ggttatggca gcactgcata attctcttac tgtoatgcca tccgtaagat gcttttctgt	3540
gactgggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtggt atgccccgac cgagttgctc	3600
ttgccccgag tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat	3660
cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag	3720
ttcgatgtaa cccactcgtg caccctaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt	3780
ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg	3840
gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta	3900
ttgtctcatg agcggatata tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc	3960
gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt	4020
aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg	4080
tgaaaacctc tgacacatgc agctcccga gacggtcaca gcttgctctgt aagcggatgc	4140
cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgctc agcgggtgtt ggcgggtgtc ggggctggct	4200
taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggg gtgaaatacc	4260

- 17 -

gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgccat tcgccattca ggctgcgcaa	4320
ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg cgaaaggggg	4380
atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa	4440
aacgacggcc agtgccaagc ttagatctcc gaaccagaaa tgcgattgcg ttcaggccca	4500
attaagaata aagctgcgtc agggcagcga cgtatcttga tccatcattg actcaccggc	4560
atcggcgtca acaccaaagc aagctcgtcc caccatagg cgtgcaccgg ccggcgtgcg	4620
ccattgaggt acatgagcgg ggcgaaagtc cgccattggt agccctgtcg tggacgcgcg	4680
gcgatgaaac gtttcccacc attgggaaga aacgtctgcg gcccatcatc ccttcaccgg	4740
atgacaaggc ggcgtcgcgc ctttgccgca gaggccggcg ggcgacatgc acagcgaagg	4800
tccgttgcg atgggaagca ggcaatcagt ggggtgccta cgccgccacg atggtcgggg	4860
agcgtaggcg ccctcccata aggcggcaag catcatgatg ctctccgatt cgggaagcct	4920
ggcgcatgc tggagagact ctctccgaga gaccagtgtg cgcaacgttc ctggcctgga	4980
agactttaaa gtgagtgtag aagggcgagc agaggacgat catcggattg caggaaccat	5040
cggcatcctc agcctgggaa ggatggctct tggtagacat tcgcggaagg tgtcctagat	5100
gtgagcgggc ttcttggtatg atcatgtcgt aactttttct gacctcgtcg gtggtacgca	5160
tggcaggatt gagcattacg gtatgcctcc cattcataaa cgataacccc ttccttcagg	5220
ttggtcatct ccatagagcg gcacgctctc aaggcctagg ctattcacac ctccctcgca	5280
acatccctat tcacgggtgtc tgtaaggaac gacttgatcat gggatcacat gaagtgcagc	5340
atactgttcg ccggtctcgc agtacagacg ctagtacggg aagtcgacat ccaagcgttc	5400
agtcaccaca tggcaaaaaa gctgcaccat actctttatg gtgagttgtt cgtgagtggt	5460
atacagtcac tcacgagggg atgcccaccg gataggggtg ggcggccgca atattcatcg	5520
cctggcaata gtcgatgtgc gtccttggtc aatgaatatc atgggtcaca tgtggagacg	5580
gttaaacagc gttgactgtg aatccctggg gtgtgttggg ccgaacaggc acgttgacgg	5640
aacaccaata tctcttcggc agcccagttc tttgcgagcg gcacaggcag gcatcgcgca	5700
acagatccca gccatccggc ctctgacatt cgggatacct gaagcccttc aggtacggag	5760
cgaagagggt ggctctctgc agcgattggc ggacggatag ctgtatttcc tctctcacca	5820
ttgggaagat gtgaaaggct ccatcatata gcggctcaac tctacctga atgtccaaac	5880
acggcgggaa tacttattta tgtggacaag gccgagctat gatagcttgc tcccgaagtt	5940
ggtaagtccc gcaatctgcg gttcaggcaa cagtctcgga aaaataagaa gaatattgta	6000
ggcgctgtga ggcgtatcgc ccaaagcgcg acacacggag gctttaggag atgaagcgcc	6060
cgtgagcggg aaggaggttg gttcaccgac gccccgaccg actctctctc tttcccagca	6120
tcattgtctcg gcgcaaactt taccctctat tgaccaactc cacgagaaag caggaacagc	6180

- 18 -

ttccctgtct ctcacgacgt ccgcaatcca gacccttagc cggttcgtta ctcacgctta 6240  
 tccctgccgc catcgtagtg gagtcagcct ggcagtgcg tagtcccgtc tctcttgctg 6300  
 cactagagaa gcccacatgag acagcgtttt ttgctttatt tctgctgttt ctatagacac 6360  
 cataggggca aacgatcctg cagcggcaga ggtattgggc tcgtcagatt ccaggttttt 6420  
 ctccctcggtc tgaatcggct gcacggcaga taaatcggcc ggaaatgcta tagcccttca 6480  
 tagcccgcta tgagagtcgc aaaaggcttg tcagtcaggt cggtcgagtg gctctcacga 6540  
 agagcgtcaa ctctgcgcga cagccgcctt tcagggcaag atagatcctc ccatcatccc 6600  
 ctactgcgct cagcgcgggt accgaacaat tgacttaccg acatcctccg ggacgcgcaa 6660  
 atgtgtttcg acggaacgta atcctcttcg tccgcctct tttcgctctc acgcattccg 6720  
 tgtggttcgc gcgacggccg ctcacagga ccagaccagt ctcaatgtct ggtaccggca 6780  
 caatggtgac actgcggcaa ctgagtaggt ctggctactc tgggtgcaccg tcgcttacgc 6840  
 tgaccttcgg gatactgtcc tgcagacatc tggagcgcct gtctttcccc tagtataaat 6900  
 gatgtctgtc cgcaggtcct tgaagaccgc tcgagtccca cttgagtttt aggtaggacc 6960  
 tgttcctcca caacccctct ttc 6983

<210> 15  
 <211> 4395  
 <212> ADN  
 <213> *Pycnopus sanguineus*

<400> 15  
 gagcttactg gatcttccag agaaatcggt ggagaggctg gccggtcagc ctcaccgaca 60  
 tttgacgtgg ccgatgattc tgtggatgcc atcgtgttgg atcctgagct tgcattccac 120  
 gccaaagcgc tcaaagctga ggtgggaagg cagggaggca caccagttcc cgaaggaggc 180  
 ggacctgaga ttgtgacgct caagattata tggaaacctc atccgctgaa ccccaacggc 240  
 cgtccggaac tctgggctat gaagcagaga cgggtaggtg aagtcgctca tcacgcctcg 300  
 ttcttactca ccatcttctg cagcacgaga atttccaccg gctttgttcc gaagtagcgg 360  
 acctcgcgag tgttcgtagt gagaacgtcg tgctttccct cgacgggaaa cgcgtgttcc 420  
 cttcatctac ccttcacagt gtcggtgtct gggcagaagc tgagctaggt tagtgactta 480  
 tcctgtgcgt gacggcacga tgcttactct tcaacagaag cttgtgacaa gatcacctac 540  
 caatacctgc aggaaaataa gcgaatgcgt tccgaatccg ttgctccgcc aacccatcct 600  
 cacctcgacg acatttcccg tcagtctcca actcgcgcgc gctccccttc catcacggag 660  
 ctgtccgaga atgaatccgg cgctgcagag tctggctcctg aagataaggg cacaagcact 720  
 ggggaggcct tcagcctgat actcgtgagc gaacggacca agggcaagcg aataaccctc 780  
 cgtgtgctcc caaccaccaa atgtggcgtc atagtctgca agttcctaga gaaggccggc 840  
 ttacaggacg aataccccga tgtcaccctt gctgcgaatg ggcgaggacg cacgaagacg 900

- 19 -

tcagccaaga caccggcgct gagcgctgat ggagataaga tggatccgga ggcacctatt	960
ggtgatgccg acctggaaga tggggatcaa gtcgaggtgg ttggtctttg atgtagcgag	1020
tgcgtggtgt tacgttttcg tcttgctatc ggtttttctg ctcttgctct gttagtaagt	1080
agtataatga tggataatca cacaacaacg tatgtgttcc agggacttct ctctcagtgg	1140
gtgtgtggct gattgtacga aacatcgac aggcctttca ccgctgctcc tagcgcgaga	1200
ccacatgaac gccctcgac gtcagtcggc ctcggaacg atagggcagt gccaaatgca	1260
ggcgaaaatg actcagttag gccacgcctg cgctttaact ttagcgctct aataccctcg	1320
acctccgtag cggctctgtg agcgcggaag gcttggcatc tacgctcttt gtccggctcg	1380
aagccactac attgagcggg tgcggcgga ggtgacaaac tgcgaggcgc aagaatgtag	1440
ccgggcctgc ggaaagggtca tgaacaaact atgtcggccc caaccagtgc taccgacacc	1500
gttctccgtg ttccagtatg ccttcagctg tcgggtggcg ggggtggctcc gatatgtgta	1560
ctcgaaacg ctccagcgc tctttgtatt gccgggtatg tgaccaacgg tgccctcatg	1620
ctcttcgctt gttgatgctc cttcaggaca ccgtctggga ctctggcaag tcagctgctg	1680
ctcgccacag ttctaggaac gtctcaatgc tcttaggcgg cggttacagc aaacgccttg	1740
caccgggatg ggcctcggtg cgcgcacag gcgaggtgt cctactcggc gttcgtagt	1800
agccccccat ccacgtaaga gtacctctg cagccaccat cgtctactag cgtaccaccc	1860
acgtccactc acatcatatg ccgcccgcg ccccggaact gattccgcgc tattgttgag	1920
atataagagg agtggtcgaa cggaccaagg agccataatc ccctcgagca ttctcgagac	1980
ctctccccac tgaactcctt cgcgctcacc aaaaaacctc gcgtagatgt cactctcat	2040
cgttactggg cctgtaggag gtcagactga gggcgctcct gctcccaacc gcctcgaaat	2100
caacgacttc gtcaagaatg aggagttctt ctgcgtttac gtccaggctc tcgggtgcgc	2160
gccttggcac atgtatgctc acccctatta ccatgaagct catgagccct cactacatac	2220
agatatcatg tatggactga agcaggagga actgatctcg ttcttccaga tcgggtggcat	2280
tcattgattg ccatacgttg cctggagtga tgccggagcg gatgacctg ctgagccgct	2340
cgggtactgt acccatggct ccgtactgtt cccgacctgg cataggcctt acgtcgcact	2400
atatgaggta agcagcttgc tagatcagac cgctacggac gacgctgaga ctcaaaatgg	2460
ctacagcaaa tcttgacaaa gtatgctgga gagatcgctg ataagtacac ggtcgacaaa	2520
ccgcgttggc agaaggcagc ggccgacctg cgccaaccct tctgggactg ggccaagaac	2580
acgtgcctc ctctgaagt catctctctc gacaaagtca cgattacgac accagatgga	2640
cagaggacgc aagttgacaa tccactccgt cgctaccgct tccatccgat cgaccccgac	2700
ttcccagagc catacagcaa ctggccagcg aactgagac atccgacaag tgatggctcg	2760
gatgccaaag acaacgtgaa ggatctcact acgtaagcca attcgccata aagacgctcc	2820
tccattcatc tcaatgtata tatgtgacag tactctgaag gcggaccagc ctgatatac	2880

- 20 -

gacgaagacg tataatctat tgaccagagt gcacacgtgg ccggcggttca gcaaccacac 2940  
 tccaggcgat ggcggcagct ccagtaacag tcttgaggcc attcacgacc acatccatga 3000  
 ctcagttggc ggcggaggcc agatgggaga cccgtccgtg gcaggatatgt gaagtgattc 3060  
 ttogcgagag acgtgactta catgtccttg taggcttcga cccaatcttc ttctgcacc 3120  
 attgccaaagt tgatcgtctt cttgcaactgt ggtccgcctt gaaccccggc gtgtgggtca 3180  
 acagctctag ctccgaagat ggcacctaca cgatcccgcc tgactctacc gtggacccaaa 3240  
 ctactgggtg gttcccgcac agctgtgcgc tgtggagtcg ccgttgactt ccatcactct 3300  
 cagcattgac gcccttcttg gatacccaaa gcacattctg gacgtccttc cagtctgctg 3360  
 gagtctcgcc cagccaattt ggctattctt accccgagtt taacggtctc aacctgcaag 3420  
 atcagaaggc tgtgaaagat cacatcgccg aggtcgtgaa cgagctctac ggtcatcgca 3480  
 tgcggaaaac cttccctttc cccagctcc aggcagtttc cgtagccaag cagggcgacg 3540  
 ccgtcactcc atccgtggct accgattcag tgtcgtcttc taccacacct gccgaaaatc 3600  
 ccgcatcccg cgaggatgcc tctgataagg acacagagcc gacgctcaat gtagagggtg 3660  
 ccgcgccagg cgcgcacttg acctccacca agtattggga ctggactgct cgcattcatg 3720  
 tcaagaagta cgaagtcgga ggcagcttca gcgtcctgct cttcctgggt gcaatccccg 3780  
 agaaccacgc ggattggcgc acgagcccca actacgttgg cggatcatcat gctttcgtga 3840  
 atagctcacc gcagcgctgc gctaactgcc gtggtcaagg cgaccttgtc atcgaaggct 3900  
 tcgtccatct caacgaggcg atcgcccgcc atgcgcacct cgaactcctc gatccaaccg 3960  
 tcgtgaggcc gtacctcacg cgcgagttgc actgggggtg gatgaaggtc agtgcctaca 4020  
 ctctgcatac gaccgtatat gtcgctaatt agatctatca aggtgaatgg caccgtcgtg 4080  
 cccctgcaag acgtcccgtc gtcgaggtt gtcgtcctct caactcctct tacccttctc 4140  
 ccgggagagc cattccctgt ccccggaacg cccgtcaatc atcatgacat caccatgga 4200  
 cgtcctgggtg gctctacca cacgcactaa gcatgctgat ggctgcccc tattgattaa 4260  
 acacgagtcg acctgagaac acatacaatg gatgtaatca tacttcactt ttgatgacaa 4320  
 tcgcttcac attctgttcc tagcgggaca gataaccag tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4380  
 aaaacactgt catgc 4395

<210> 16  
 <211> 618  
 <212> PRT  
 <213> Pycnopus sanguineus

<400> 16

Met Ser His Phe Ile Val Thr Gly Pro Val Gly Gly Gln Thr Glu Gly  
 1 5 10 15

- 21 -

Ala Pro Ala Pro Asn Arg Leu Glu Ile Asn Asp Phe Val Lys Asn Glu  
                   20                  25                  30

Glu Phe Phe Ser Leu Tyr Val Gln Ala Leu Asp Ile Met Tyr Gly Leu  
           35                  40                  45

Lys Gln Glu Glu Leu Ile Ser Phe Phe Gln Ile Gly Gly Ile His Gly  
       50                  55                  60

Leu Pro Tyr Val Ala Trp Ser Asp Ala Gly Ala Asp Asp Pro Ala Glu  
       65                  70                  75                  80

Pro Ser Gly Tyr Cys Thr His Gly Ser Val Leu Phe Pro Thr Trp His  
                   85                  90                  95

Arg Pro Tyr Val Ala Leu Tyr Glu Gln Ile Leu His Lys Tyr Ala Gly  
                   100                  105                  110

Glu Ile Ala Asp Lys Tyr Thr Val Asp Lys Pro Arg Trp Gln Lys Ala  
           115                  120                  125

Ala Ala Asp Leu Arg Gln Pro Phe Trp Asp Trp Ala Lys Asn Thr Leu  
       130                  135                  140

Pro Pro Pro Glu Val Ile Ser Leu Asp Lys Val Thr Ile Thr Thr Pro  
       145                  150                  155                  160

Asp Gly Gln Arg Thr Gln Val Asp Asn Pro Leu Arg Arg Tyr Arg Phe  
                   165                  170                  175

His Pro Ile Asp Pro Ser Phe Pro Glu Pro Tyr Ser Asn Trp Pro Ala  
                   180                  185                  190

Thr Leu Arg His Pro Thr Ser Asp Gly Ser Asp Ala Lys Asp Asn Val  
           195                  200                  205

Lys Asp Leu Thr Thr Thr Leu Lys Ala Asp Gln Pro Asp Ile Thr Thr  
       210                  215                  220

Lys Thr Tyr Asn Leu Leu Thr Arg Val His Thr Trp Pro Ala Phe Ser  
       225                  230                  235                  240

Asn His Thr Pro Gly Asp Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Leu Glu Ala  
                   245                  250                  255

Ile His Asp His Ile His Asp Ser Val Gly Gly Gly Gly Gln Met Gly  
           260                  265                  270

Asp Pro Ser Val Ala Gly Phe Asp Pro Ile Phe Phe Leu His His Cys

- 22 -

275

280

285

Gln Val Asp Arg Leu Leu Ala Leu Trp Ser Ala Leu Asn Pro Gly Val  
 290 295 300

Trp Val Asn Ser Ser Ser Ser Glu Asp Gly Thr Tyr Thr Ile Pro Pro  
 305 310 315 320

Asp Ser Thr Val Asp Gln Thr Thr Ala Leu Thr Pro Phe Trp Asp Thr  
 325 330 335

Gln Ser Thr Phe Trp Thr Ser Phe Gln Ser Ala Gly Val Ser Pro Ser  
 340 345 350

Gln Phe Gly Tyr Ser Tyr Pro Glu Phe Asn Gly Leu Asn Leu Gln Asp  
 355 360 365

Gln Lys Ala Val Lys Asp His Ile Ala Glu Val Val Asn Glu Leu Tyr  
 370 375 380

Gly His Arg Met Arg Lys Thr Phe Pro Phe Pro Gln Leu Gln Ala Val  
 385 390 395 400

Ser Val Ala Lys Gln Gly Asp Ala Val Thr Pro Ser Val Ala Thr Asp  
 405 410 415

Ser Val Ser Ser Ser Thr Thr Pro Ala Glu Asn Pro Ala Ser Arg Glu  
 420 425 430

Asp Ala Ser Asp Lys Asp Thr Glu Pro Thr Leu Asn Val Glu Val Ala  
 435 440 445

Ala Pro Gly Ala His Leu Thr Ser Thr Lys Tyr Trp Asp Trp Thr Ala  
 450 455 460

Arg Ile His Val Lys Lys Tyr Glu Val Gly Gly Ser Phe Ser Val Leu  
 465 470 475 480

Leu Phe Leu Gly Ala Ile Pro Glu Asn Pro Ala Asp Trp Arg Thr Ser  
 485 490 495

Pro Asn Tyr Val Gly Gly His His Ala Phe Val Asn Ser Ser Pro Gln  
 500 505 510

Arg Cys Ala Asn Cys Arg Gly Gln Gly Asp Leu Val Ile Glu Gly Phe  
 515 520 525

Val His Leu Asn Glu Ala Ile Ala Arg His Ala His Leu Asp Ser Phe  
 530 535 540

- 23 -

Asp Pro Thr Val Val Arg Pro Tyr Leu Thr Arg Glu Leu His Trp Gly  
545 550 555 560

Val Met Lys Val Asn Gly Thr Val Val Pro Leu Gln Asp Val Pro Ser  
565 570 575

Leu Glu Val Val Val Leu Ser Thr Pro Leu Thr Leu Pro Pro Gly Glu  
580 585 590

Pro Phe Pro Val Pro Gly Thr Pro Val Asn His His Asp Ile Thr His  
595 600 605

Gly Arg Pro Gly Gly Ser His His Thr His  
610 615

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☒ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**